



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Bianca Baccili Zanotto Vigna

**“Estudos genético-moleculares em *Brachiaria humidicola*
(Rendle) Schweick. (Poaceae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Bianca Baccili Zanotto Vigna
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Vegetal
e Melhoramento.

Orientadora: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia

Campinas – São Paulo – Brasil

Dezembro de 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
BIOLOGIA – UNICAMP**

V683e	<p>Vigna, Bianca Baccili Zanotto Estudos genético-moleculares em <i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick (Poaceae) / Bianca Baccili Zanotto Vigna – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Anete Pereira de Souza, Antonio Augusto Franco Garcia. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Marcadores microssatélites. 2. Diversidade genética. 3. Mapeamento genético. 4. Plantas forrageiras. 5. Poliplóide. I. Souza, Anete Pereira de. II. Garcia, Antonio Augusto Franco. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
--------------	--

Título em Inglês: Genetic and molecular studies in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae).

Palavras-chave em inglês: Microsatellite markers; Genetic diversity; Genetic mapping; Forage plants; Polyploid.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca Examinadora: Anete Pereira de Souza, Rodolfo Godoy, José Baldin Pinheiro, Liana Jank, Sérgio Furtado dos Reis.

Data da defesa: 06/12/2010

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 06 de dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)


Assinatura

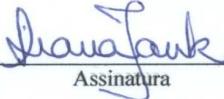
Dra. Patrícia Menezes Santos

Assinatura

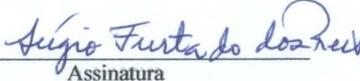
Prof. Dr. José Baldin Pinheiro


Assinatura

Dra. Liana Jank


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado Reis


Assinatura

Dr. Rodolfo Godoy


Assinatura

Prof. Dr. Mateus Mondin

Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
13 de agosto de 2010.

CIBio: 06/2010

Projeto CIBio: 14/2003

Identificação:

Doutorado: Bianca Baccili Zanotto Vigna

Projeto: Estudos genético-moleculares em *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae).

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 03/02/2003 sob número 14/2003
(em andamento)

Coordenador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edi Lúcia Sartorato".

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

Aos meus queridos pais,

Claudio Roberto Vigna e

Mariângela Baccili Zanotto,

pelo apoio incondicional e pelo amor,

DEDICO

v

Agradecimentos

Aos meus pais, **Claudio Roberto Vigna e Mariângela Baccili Zanotto**,
pelo apoio incondicional, pelo incentivo, por sempre acreditarem em mim, pela minha educação e pela
minha vida.

Ao meu irmão **Bruno Zanotto Vigna**,
pela agradável convivência e pelo apoio e incentivo

Ao meu namorado **Marcelo Monge Egea**,
pelo apoio incondicional, pelo amor, pela amizade, pela compreensão e por me fazer feliz

À minha família, **Vó Totonha, Tia Mize, Tio Marinho, Tio Fredinho e Tia Kátia**,
pelo apoio, pela torcida, pela presença em minha vida

À Maria José dos Santos Vilela, a **Zezé**,
por todo amor, palavras de carinho, por tornar meu dia-a-dia mais leve

À minha orientadora, **Profa. Dra. Anete Pereira de Souza**,
pela orientação segura e de grande relevância científica, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pelo
apoio e incentivo

Ao meu co-orientador **Dr. Antonio Augusto Franco Garcia**,
pelas valiosas discussões, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, por me fazer pensar diferente

À pesquisadora **Dra. Cacilda Borges do Valle**,

pelo conhecimento e informações compartilhados, pela agradável convivência, pelas discussões dos resultados, pela oportunidade de conhecer mais de perto as braquiárias

À amiga, colega e colaboradora **Dra. Letícia Jungmann,**

pela oportunidade de entrar no mundo das forrageiras, pela confiança, pela amizade, pelo conhecimento e valiosas discussões

À **Dra. Maria Imaculada Zucchi,**

pelas sugestões, pelo auxílio na execução das análises e pelo carinho

À **Dra. Maria Suely Pagliarini,**

pela gentileza em ceder informações citogenéticas e pelas valiosas discussões dos resultados

Às pesquisadoras da Embrapa Gado de Corte, **Dra. Liana Jank, Dra. Lucimara Chiari, Dra. Rosângela M. S. Resende,** pela acolhida em todas as vezes que estive na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande e pelo conhecimento e discussões sobre as forrageiras tropicais

Aos membros da banca de qualificação **Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira , Dr. Michel Georges Albert Vincentz e Dr. João Vasconcellos,**

pelas valiosas sugestões e disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho

Aos membros da pré-banca **Dr. Sérgio Furtado Reis, Dr. Rodrigo Gazaffi e Dra. Maria Elisa Z. Paterniani,**

pelas valiosas sugestões, inestimáveis contribuições e disponibilidade durante a avaliação desse trabalho

Aos **membros da banca examinadora,**

por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho, pela análise da tese e comentários construtivos

À todos **amigos e colegas do Laboratório de Análise Genética e Molecular,**

pelo apoio, pela amizade, pela cumplicidade e troca de experiência durante a realização dos experimentos, pelos momentos de descontração e pelo carinho durante todos esses anos de convivência

Ao amigo **Dr. Juverlande Lugli,**

cujo incentivo e ajuda foram constantes

Aos colegas **Guilherme Carvalho Alleoni e Msc. Jean Carlos Santos,**

pela ajuda e contribuição significativas nesse trabalho

À técnica **Patrícia Zambom,**

por toda ajuda prestada durante a condução dos experimentos

Ao técnico **Carlos Corona,**

pelo apoio no dia-a-dia do laboratório

Às secretárias **Sandra Lima e Tânia Zambom** do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp pela cordial atenção, profissionalismo e carinho em me atender em todos os momentos que precisei.

Aos colegas **Dra. Maria Marta Pastina, Dr. Rodrigo Gazaffi e Msc. Marcelo Mollinari,**

da Esalq/USP, pela imensa ajuda nas análises e discussões dos resultados

Às amigas **Gisele O. C. Leguizamon e Msc. Cristiane Zorzatto,**

pela imensa ajuda durante a coleta do material vegetal no campo, pelos momentos de descontração no laboratório e pela amizade

À todos **meus amigos**,

inúmeros, que me apoiaram, incentivaram e participaram desse processo, cada um à sua maneira, um agradecimento especial por sua amizade

À **Universidade Estadual de Campinas**,

por todo o conhecimento e experiência adquiridos ao longo destes sete anos de estudos nesta instituição

À **Embrapa Gado de Corte**,

pelo apoio científico e financeiro, pelo acesso ao material vegetal, pelo conhecimento adquirido através de seus pesquisadores e pela oportunidade de vivenciar o mundo das forrageiras

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**,

pelo suporte financeiro e técnico-científico durante a realização deste trabalho

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**,

pelo suporte financeiro e técnico-científico durante a realização desse trabalho

À todos os **professores e pesquisadores** que, ao longo

de minha vida acadêmica, contribuíram com ensinamentos e pensamentos que estarão presentes ao longo de toda a minha vida.

À todos que contribuíram para o andamento deste trabalho e tornaram possível esta conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
PREFÁCIO	1
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
IMPORTANCIA ECONOMICA DAS FORRAGEIRAS TROPICAIS.....	5
O GÊNERO <i>Brachiaria</i>	6
Germoplasma de <i>Brachiaria spp</i>	8
Melhoramento genético de <i>Brachiaria spp</i>	10
Biologia básica no gênero <i>Brachiaria</i>	12
<i>Brachiaria humidicola</i>	14
POLIPLÓIDES.....	17
MARCADORES MOLECULARES.....	22
Marcadores moleculares do tipo microssatélites (SRR).....	24
Detecção do polimorfismo através de marcadores moleculares em poliplóides.....	25
Marcadores moleculares no gênero <i>Brachiaria</i>	27
MAPEAMENTO GENÉTICO.....	28
Mapeamento genético em poliplóides.....	31
APOMIXIA.....	33
Herança da apomixia.....	35

Determinação do modo de reprodução no gênero <i>Brachiaria</i>	36
Mapeamento genético da apomixia.....	38
OBJETIVOS	40
CAPÍTULO I	
“Development of microsatellite markers for <i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick.”, publicado na revista <i>Conservation Genetics Resources</i> em 2009.....	41
CAPÍTULO II	
“Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass <i>Brachiaria humidicola</i> based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin”, publicado na revista <i>Genome</i> em 2010.....	50
CAPÍTULO III	
Construção de um mapa genético e mapeamento da aposporia para a gramínea hexaplóide <i>Brachiaria humidicola</i> , uma forrageira tropical.....	80
RESUMO DOS RESULTADOS	122
CONCLUSÕES	125
PERSPECTIVAS	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	127
ANEXO I “Characterization of 12 microsatellite loci from an enriched genomic library in polyploid <i>Tibouchina pulchra</i> Cogn. (Melastomataceae)”.....	153

Vigna, Bianca Baccili Zanotto Vigna. Estudos genético-moleculares em *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). 2010. 160p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Pós-graduação – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas – SP.

RESUMO

As pastagens cultivadas constituem a forma mais econômica de fornecer alimentação abundante e de qualidade aos animais. As gramíneas do gênero *Brachiaria* representam as forrageiras mais utilizadas no Brasil, dentre as quais a espécie *B. humidicola* caracteriza-se por ser tolerante à solos úmidos, à cigarrinha-das-pastagens, principal praga das pastagens, e apresentar elevada produção. O conhecimento da extensão da variabilidade genética contida dentro dos bancos de germoplasma pode auxiliar no planejamento de estratégias para maximizar os ganhos genéticos em programas de melhoramento. Além disso, a construção de mapas de ligação é uma importante fonte de informações a respeito da estrutura do genoma e da genética de características de interesse agrônomo. Nesse contexto, foram isolados e caracterizados marcadores microssatélites para a espécie como ferramenta para o estudo da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de *B. humidicola* e a construção de um mapa genético e posterior mapeamento do modo de reprodução por apomixia do tipo aposporia. Foram desenvolvidos 154 marcadores microssatélites para a espécie. Os resultados da análise do banco de germoplasma revelaram quatro grupos de acessos que apresentam diferenças significativas entre si, além do único acesso sexual, o qual ficou isolado dos demais acessos, mostrando-se bem distante geneticamente. Esses dados fornecem importantes subsídios para o programa de melhoramento da espécie, orientando cruzamentos e futuras coletas de acessos. O mapa genético desenvolvido conta com 124 marcas em dose-única (geradas a partir de 79 locos microssatélites polimórficos na população de mapeamento)

distribuídas em 38 grupos de ligação, com uma cobertura de 1.543,8cM do genoma hexaplóide ($2n=6x=36$) da espécie, com uma densidade de 12,3cM. O modo de reprodução por aposporia foi mapeado em um único grupo de ligação, de acordo com o esperado, por provavelmente estar associada a uma região genômica específica associada à aposporia (ASGR). Com base no perfil de amplificação dos locos microssatélite e em dados sobre o comportamento meiótico de 45 desses híbridos, pode-se sugerir que os genótipos hexaplóides desta espécie tenham origem autoalopoliplóide, corroborando alguns estudos citogenéticos e moleculares para a espécie.

Palavras chave: *Urochloa humidicola*; marcadores microssatélites; diversidade genética; mapa genético; poliplóide

Vigna, Bianca Baccili Zanotto Vigna. Genetic and molecular studies in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). 2010. 160p. PhD Thesis. (PhD in Genetics and Molecular Biology) – University of Campinas – UNICAMP – Campinas – SP – Brazil.

ABSTRACT

Cultivated pastures are the most economic way to produce quality feed in abundance to the animal herd. Grasses from the genus *Brachiaria* are the ones most plants for pastures in Brazil. Among those, the species *B. humidicola* is the most adapted to poor drained soils, is tolerant to spittlebugs, the major pest of the tropical forage grasses and is very productive. The knowledge about extension of the genetic variability in the germplasm banks can help to plan out strategies to maximize the gains in breeding programs. The construction of genetic maps is an important source of information about the genome structure and the genetics of characteristics that are important to agronomic studies. Based on this, microsatellite loci have been isolated and characterized for this species as a tool to study genetic diversity in the germplasm bank and the construction of a linkage map and apospory mapping. In total, 154 microsatellite loci were developed for this species. The results obtained from the germplasm analysis show that the germplasm is divided into four major groups and the only sexual accession was keep separated, showing its high divergence from the other accessions. These data are important to the breeding program of the species to define crosses and for future collections. The genetic map developed is formed by 124 single-dose markers (generated from 79 polymorphic SSR loci in the mapping population) distributed in 38 linkage groups, covering 1.543,8cM of the hexaploid genome ($2n=6x=36$) of the species, with a density of 12,3cM. The reproductive mode through apospory has been mapped in only one linkage group, as expected, as it is probably linked to an apospory-specific genomic region (ASGR), described in other grasses. Based on the

amplification pattern of the microsatellite loci and in meiotic behaviour data of 45 hybrids from the mapping population, an autoallopolyploid origin can be suggested for the hexaploid genotypes of this species, corroborating some molecular and cytogenetics studies in *B. humidicola*.

Keywords: *Urochloa humidicola*; microsatellite markers; genetic diversity; genetic mapping; polyploid

PREFÁCIO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho de tese estão apresentados na forma de artigos científicos. O primeiro artigo, *Development of microsatellite markers for Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick*, publicado na revista *Conservation Genetics Resources* (1: 475–479) em 2009, descreve o desenvolvimento dos primeiros marcadores microssatélites para a espécie.

O segundo artigo, *Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass Brachiaria humidicola based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin*, publicado na revista *Genome* (53: 698–709) em 2010, apresenta o estudo de diversidade genética do banco de germoplasma da espécie através de dados moleculares e a comparação destes resultados com dados citogenéticos, morfológicos e do local de coleta dos acessos.

O terceiro artigo, *Construção de um mapa genético e mapeamento da aposporia para a gramínea hexaplóide Brachiaria humidicola, uma forrageira tropical*, apresenta o desenvolvimento de novos marcadores microssatélites, o mapa genético construído para a população de mapeamento ‘H031 x cv. BRS Tupi’ e o mapeamento genético da aposporia para a espécie em estudo, ainda a ser submetido.

Espera-se que os resultados aqui mostrados possam contribuir para o melhor entendimento da genética da espécie poliplóide *Brachiaria humidicola* e fornecer ferramentas moleculares e informações relevantes a fim de contribuir para a maximização dos ganhos genéticos no programa de melhoramento da espécie.

Durante o doutorado, participei de um estudo sobre diversidade genética de duas populações naturais de *Tibouchina pulchra*, uma espécie arbórea da Mata Atlântica, juntamente com o Msc. Vinícius L. G. Brito, como parte de sua dissertação de mestrado. Este trabalho

rendeu a publicação de uma nota técnica sobre o desenvolvimento de marcadores microssatélites desenvolvidos para esta espécie, intitulada “*Characterization of 12 microsatellite loci from an enriched genomic library in polyploid Tibouchina pulchra Cogn. (Melastomataceae)*”, publicado na revista *Conservation Genetics Resources* (2: 193–196) em 2010, e apresentado aqui como Anexo I. Outro artigo a respeito da estrutura populacional e diversidade genética está sendo preparado para publicação.

INTRODUÇÃO

As pastagens cultivadas no Brasil muito contribuem para a produção de carne, leite e couro. Mais de 120 milhões de hectares são cobertos por pastagens cultivadas, sendo 85% ocupadas por gramíneas do gênero *Brachiaria* (Macedo, 2006). A espécie *Brachiaria humidicola* ocorre em locais mais úmidos, de drenagem deficiente ou com inundação sazonal, razão pela qual ela ocupa extensas áreas no cerrado e região amazônica (Valle *et al.*, 2008).

As variedades comerciais de *Brachiaria* existentes no Brasil são poucas e, por serem exóticas e reproduzirem-se na sua maioria por apomixia, não geram muita variabilidade para seleção. A apomixia é uma forma de reprodução assexuada presente em mais de 35 famílias de plantas onde há a produção de sementes clonais, idênticas às plantas mães, o que permite a reprodução de um genótipo de interesse (Gauer & Cavalli-Molina, 2000). Essas características, juntamente com a necessidade de avaliação agronômica sob pastejo, tornam o processo de geração de uma cultivar ainda mais demorado. A Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, MS, possui um programa de melhoramento de espécies de *Brachiaria*, o qual encontra limitações devido aos diferentes níveis de ploidia encontrados nos genótipos e ao modo de reprodução por apomixia.

O tempo de lançamento de uma cultivar pode ser diminuído com o uso de ferramentas moleculares, que apresentam um grande potencial na melhoria da eficiência dos programas de melhoramento, graças à rápida identificação de características a serem selecionadas em uma geração. Além disso, permitem a identificação de híbridos, a caracterização molecular de cultivares, identificação e quantificação de fluxo gênico e também mensuração da diversidade genética. Informações obtidas a partir destes marcadores têm contribuído para um melhor

entendimento da evolução e genética tanto de espécies diplóides quanto poliplóides (Soltis & Soltis, 1993).

O banco de germoplasma de *Brachiaria humidicola* está instalado na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, MS, e possui 58 acessos. Dentre estes acessos, somente um é sexual – H031 – o qual está sendo utilizado como fonte de sexualidade em cruzamentos com acessos apomíticos de ploidia compatível. Uma progênie F₁ foi gerada e está sendo avaliada para algumas características agronômicas.

Nesse contexto, o presente trabalho buscou desenvolver marcadores microssatélites para *Brachiara humidicola* e usar estes marcadores para avaliar a variabilidade genética do banco de germoplasma da espécie e estudar o genoma e o comportamento desse genoma em um cruzamento intra-específico a partir da construção de um mapa genético para a espécie. Além disso, buscou-se a associação de um marcador molecular à apomixia do tipo aposporia.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

No Brasil, a pecuária bovina de corte e de leite baseia-se, predominantemente, na utilização de pastagens para a alimentação animal, onde aproximadamente 90% dos nutrientes que os ruminantes precisam são obtidos diretamente do pasto (Euclides *et al.*, 2010). Estas pastagens cobrem extensas áreas, hoje estimadas em cerca de 163 milhões de hectares, e abrigam cerca de 171 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2006), constituindo o maior rebanho comercial do mundo (Torres Jr *et al.*, 2004).

O rebanho brasileiro tem destaque no mercado mundial graças a algumas características que possibilitaram seu estabelecimento como o maior exportador de carne bovina do mundo desde 2003 (Cançado, 2009). O esforço em pesquisa no melhoramento de espécies forrageiras e no manejo do pasto, resultando no aumento significativo na eficiência da utilização do pasto (Euclides *et al.*, 2010), refletiu-se no aumento de 12% no rebanho brasileiro e concomitante redução de 8,3% na área coberta por pastagens entre 1995 e 2006 (IBGE, 2006), o que representa um ganho de produtividade significativo. Além disso, a alimentação de origem vegetal atende à crescente demanda por segurança alimentar e à diminuição de problemas sanitários, conferindo uma vantagem competitiva da carne brasileira tanto no mercado nacional como no internacional (Cançado, 2009).

A utilização de pastagens com alto valor nutritivo é um dos fatores mais importantes para a redução de custos na produção agropecuária. As gramíneas provêm energia, proteína e fibras para promover a mastigação, ruminação e saúde do animal (Leopoldino, 2000). Entretanto, muitas vezes, apresentam baixo teor protéico, que pode ser compensado com o

plântio de leguminosas em associação às gramíneas. Dessa forma, melhora-se o valor nutritivo da dieta animal e contribui-se para a diminuição do processo erosivo das áreas produtivas (Souza, 2002; Diáz *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2004; Barcellos, 2008).

As pastagens tropicais são formadas por plantas de poucos gêneros de gramíneas e leguminosas (Valle *et al.*, 2008), sendo 85% dos pastos cultivados formados por capins do gênero *Brachiaria* (Macedo, 2006). As principais gramíneas forrageiras tropicais cultivadas são dos gêneros *Brachiaria* e *Paspalum*, e da espécie *Panicum maximum*. Espécies dos gêneros *Cynodon*, *Pennisetum* e *Sorghum*, além das espécies *Hyparrhenia rufa* (capim-jaraguá), *Cenchrus ciliaris* e *Melinis minutiflora* (capim-gordura), também são cultivadas, porém em menor escala. As principais leguminosas utilizadas em pastagens são *Stylosanthes* spp., *Glycine* spp., *Arachis pintoi*, *Calopogonium mucunoides*, *Cajanus cajan*, *Pueraria phaseoloides* e *Leucaena leucocephala* (Pires, 2006; Sousa, 2010).

O GÊNERO *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae. Foi primeiramente descrito como uma subdivisão do gênero *Panicum* por Trinius (1834), sendo posteriormente, elevado à categoria de gênero por Grisebach (1853). A delimitação taxonômica dos gêneros *Brachiaria*, *Eriochloa*, *Urochloa* e *Panicum* (Renvoize *et al.*, 1996) tem se mostrado inconclusiva e controversa, devido a problemas de circunscrição destes gêneros. Diversos autores realocaram espécies de *Brachiaria* que possuem antécio rugoso para *Urochloa* (Morrone & Zuloaga, 1992; Gonzalez & Morton, 2005), entretanto, alguns autores discordam desta transferência das espécies anuais de *Brachiaria* para *Urochloa* (Veldkamp, 1996; Webster, 1987). O gênero *Urochloa* é caracterizado por possuir antécio fértil transversalmente rugoso, com ornamentação na parte superior e espiguetas caducas por inteiras,

enquanto que o gênero *Brachiaria* possui antécio fértil liso sem ornamentação e antécio decíduo antes da espiguetta. Dessa forma, espécies inicialmente descritas como *Brachiaria* e que, entretanto, apresentavam antécio rugoso, foram transferidas para *Urochloa* (Gouveia-Santos, 2001). Entretanto, Thompson & Estes (1986) descreveram vários níveis de rugosidade do antécio fértil entre os gêneros *Brachiaria*, *Eriochloa* e *Urochloa*, o que dificultaria o estabelecimento de barreiras taxonômicas entre eles.

Brachiaria é um gênero de gramíneas que compreende aproximadamente 100 espécies (Miles *et al.*, 1996), distribuídas pelos trópicos, especialmente na África (Renvoize *et al.*, 1996). As espécies americanas deste gênero não apresentam características interessantes para o forrageio de animais. Entretanto, no continente africano, existe uma grande quantidade de braquiárias com potencial forrageiro, graças à co-evolução dessas gramíneas com ruminantes herbívoros de grande porte. A pressão de seleção sobre as plantas consumidas sob pastejo contribuiu, de forma decisiva, para sua evolução como planta forrageira na África (Walton, 1983). Algumas dessas espécies africanas foram introduzidas no Brasil a partir de 1952 (Serrão & Simão Neto, 1971).

Cinco espécies de *Brachiaria* são nativas do Brasil: *B. adspersa*, *B. fasciculata*, *B. mollis*, *B. reptans* e *B. venezuelae*. Outras três espécies são consideradas naturalizadas, por terem sido introduzidas desde o período colonial, como cama para os escravos em navios negreiros: *B. extensa*, *B. mutica* e *B. plantaginea* (Parsons, 1972; Sendulsky, 1978).

As espécies forrageiras de *Brachiaria* mais cultivadas no Brasil são originárias da África Tropical. *Brachiaria decumbens*, que foi introduzida oficialmente em 1952, *B. brizantha*, em 1965, e *B. ruziziensis*, *B. humidicola* e *B. dictyoneura* na década de 1960 (Sendulsky, 1978; Renvoize *et al.*, 1996).

Dentre as espécies de *Brachiaria* mais importantes como forrageiras, *B. brizantha* tem a maior distribuição natural no continente africano, tendo sido extensamente coletada desde a Etiópia até a África do Sul. Esta espécie também é encontrada nos países do Golfo da Guiné, como Nigéria e Camarões, no oeste africano. A segunda espécie em abrangência é a *B. humidicola* encontrada nos mesmos países que *B. brizantha*, porém em locais mais úmidos ou mal-drenados. *B. decumbens* e *B. ruziziensis* apresentam uma distribuição bem mais restrita, tendo sido coletadas em Uganda, Ruanda e Burundi e, menos freqüentemente, no Zaire. *B. dictyoneura* está restrita a países do extremo leste, como Tanzânia e Quênia e *B. mutica* e *B. arrecta* são forrageiras muito palatáveis e adaptadas a solos encharcados e férteis, sendo originárias do oeste africano (Keller-Grein *et al.*, 1996)

As forrageiras do gênero *Brachiaria* alcançaram grande importância no Brasil nos últimos trinta anos, viabilizando a atividade pecuária nos solos fracos e ácidos do Cerrados e criando novos pólos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central. As espécies de *Brachiaria* economicamente importantes não podem ser consideradas domesticadas, pois essas espécies não dependem do homem para sobrevivência e ainda não sofreram modificação em sua adaptação ecológica e diferenciação morfológica (Pereira *et al.*, 2001).

Germoplasma de *Brachiaria* spp.

Em resposta à grande demanda por diversificação das pastagens tropicais e buscando reunir variabilidade genética do gênero *Brachiaria*, entre os anos de 1984 e 1985, o CIAT (*Centro Internacional de Agricultura Tropical*), financiado pelo IBPGR (*International Board for Plant Genetic Resources*) com colaboração do ILCA (*International Livestock Center for Africa*), realizou uma ampla coleta de germoplasma no Leste da África. Além desta expedição,

posteriormente alguns outros órgãos realizaram coletas de *Brachiaria* spp. durante outras expedições (Keller-Grein *et al.*, 1996).

A principal coleção, com 687 acessos de 27 espécies diferentes de *Brachiaria*, encontra-se no CIAT (Colômbia). Parte desta coleção foi levada para o ILCA (Etiópia), com 522 acessos e para o Brasil, num acordo com a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Esta coleção brasileira encontra-se hoje alocada na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande/MS, onde 455 acessos estão disponíveis para o programa de melhoramento genético do gênero (Valle *et al.*, 2008). Outras coleções de menor porte encontram-se no ATFGRC/CSIRO (*Australian Tropical Forage Genetic Resource Centre/ Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* na Austrália) com 177 acessos, USDA (*United States Department of Agriculture*) com 90 acessos, GBK (*Genebank of Kenya*) com 51 acessos e RGI/ARC (*Roodeplat Grassland Institute/African Research Council*) com 39 acessos (Keller-Grein *et al.*, 1996).

A coleção brasileira de *Brachiaria* spp. permanece pouco explorada pela falta de conhecimentos básicos e equipes estruturadas para conduzi-los, com exceção das cinco espécies mais importantes (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. humidicola*, *B. dictyoneura*), as quais têm sido estudadas do ponto de vista agrônômico, morfológico, citogenético e molecular. *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* formam um complexo agâmico que possibilita a geração de híbridos interespecíficos, e *B. humidicola* apresenta um acesso sexual conhecido que permite a realização de cruzamentos intraespecíficos, mas outras espécies poderão representar novos avanços tão logo seja conhecida a filogenia desse gênero (Valle *et al.*, 2008).

Melhoramento genético de *Brachiaria* spp.

O programa de melhoramento genético de *Brachiaria*, realizado pela Embrapa Gado de Corte, teve início na década de 1980 com a importação do germoplasma vindo da África, como já mencionado. Até recentemente, o principal método de melhoramento utilizado foi a seleção de acessos superiores, que resultou nas seguintes cultivares forrageiras no Brasil, as mais comercializadas atualmente:

1. Capim-marandu, cultivar de *Brachiaria brizantha*, também conhecido como “braquiarião”, disponível desde 1984. É o mais cultivado no Brasil e estima-se que, em 2006, os benefícios econômicos gerados foram superiores a 3,9 bilhões de reais. É a melhor alternativa de forrageira resistente às cigarrinhas típicas de pastagens, como *Notozulia entreriana*, *Deois flavopicta*, *D. incompleta*, *D. schach* e *Aeneolamia selecta*. Tem boa tolerância ao sombreamento, ao fogo e à seca.
2. Capim-xaraés, cultivar de *Brachiaria brizantha*, disponível desde 2003. Vigorosa, cobre bem o solo, é mais tolerante a solos com drenagem deficiente quando comparada a cv. Marandu. Tem uma grande capacidade de suporte e produz mais peso vivo por hectare, por ano, em animais de corte.
3. Capim-piatã, cultivar de *Brachiaria brizantha*, lançada em 2007. É uma opção para a diversificação das pastagens, apresenta o maior ganho individual dos animais e melhor valor nutritivo em relação às outras, tendo produção de forragem de melhor qualidade que as cv. Marandu e Xaraés.
4. BRS Tupi, cultivar de *Brachiaria humidicola*, a ser lançada em 2011. Apresenta melhor valor nutritivo, melhor relação folha:colmo, maior disponibilidade de folhas, mais ganho de peso animal por cabeça e por área, rebrota mais rápida, estabelecimento mais rápido, melhor cobertura do solo, melhor resposta a adubação quando comparada à cv. Tully (*B.*

humidicola comum). É uma alternativa às outras cultivares disponíveis no mercado (cv. Tully e cv. Llanero) para áreas úmidas de várzeas.

A realização de cruzamentos intra e interespecíficos para a obtenção de cultivares híbridas só foi possível após a obtenção de acessos diplóides sexuais tetraploidizados artificialmente. Dentro do complexo agâmico *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, somente a última apresenta sexualidade obrigatória no nível diplóide, enquanto as outras apresentam predominantemente acessos apomíticos tetraplóides naturais. Dessa forma, acessos de *B. ruziziensis* foram tetraploidizados artificialmente, na Bélgica, por Swenne *et al.* (1981) e Gobbe *et al.* (1981) através do antimitótico colchicina. Os acessos tetraploidizados de *B. ruziziensis* foram cruzados com a cultivar altamente produtiva e resistente à cigarrinha-das-pastagens *B. brizantha* cv Marandu, e com a *B. decumbens* cv Basilisk, vigorosa e tolerante a solos ácidos. *B. ruziziensis* é muito nutritiva, com rápida rebrota e de florescimento concentrado.

Mais recentemente, Simioni & Valle (2009) obtiveram genótipos sexuais tetraploidizados em *B. decumbens*, que permitiram a realização com sucesso de cruzamentos intraespecíficos e a progênie está sendo avaliada dentro do programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte (Cacilda Borges do Valle, comunicação pessoal). Pinheiro *et al.* (2000) também obtiveram sexuais tetraploidizados, mas da espécie *B. brizantha*. Não foi possível o cruzamento intraespecífico pela assincronia de florescimento entre as sexuais tetraploidizadas e as apomíticas naturais.

No caso de *B. humidicola*, a existência de um acesso sexual hexaplóide possibilitou a realização de cruzamento intraespecífico com a cultivar apomítica hexaplóide BRS Tupi, gerando a população estudada neste trabalho.

O método de melhoramento de *Brachiaria* spp. consiste basicamente na obtenção de uma progênie a partir de um cruzamento entre uma planta sexual e uma planta apomítica, doadora de pólen. Os híbridos apomíticos são avaliados, primeiramente, sob corte em pequenas parcelas para aspectos de produção de forragem e de ataques de pragas e doenças. Na fase seguinte, os materiais selecionados são avaliados sob corte em parcelas um pouco maiores, normalmente em ensaios regionais (5 a 7 locais), em que a adaptação a diferentes condições ambientais é averiguada. A seguir, os materiais selecionados nessa fase, são avaliados em ensaios de pastejo para mensurar a produção por animal e por área. Por fim, os híbridos são selecionados sob pastejo e nomeados para registro. Os híbridos sexuais são utilizados para retrocruzamento com apomíticos (Araújo *et al.*, 2008).

Biologia básica no gênero *Brachiaria*

O programa de melhoramento de braquiárias depende do conhecimento do modo de reprodução, dos níveis de ploidia e do comportamento cromossômico para a realização de cruzamentos intra e interespecíficos em *Brachiaria* entre biótipos sexuais citogeneticamente compatíveis com biótipos apomíticos a fim de gerar híbridos férteis (Valle, 1990; Valle *et al.*, 2008).

O gênero é caracterizado por uma maioria de espécies poliplóides (de 4x a 10x) e apomíticas, e alguns sexuais naturais. O número básico de cromossomos para o gênero pode ser $n=6$ (Risso-Pascotto *et al.*, 2006a; Boldrini *et al.*, 2009b), $n=7$ ou $n=9$ (Darlington & Wylie, 1955) e formam uma série poliplóidica. Ferguson & Crowder (1974) demonstraram a impossibilidade de realizar cruzamentos interplóidicos, o que restringe os cruzamentos e dificulta o melhoramento das espécies, fazendo-se necessários alguns estudos citogenéticos. Além disso, o melhoramento de espécies apomíticas exige a identificação do modo de

reprodução em cada etapa do programa e limita os cruzamentos pela existência de poucas fontes de sexualidade (Valle *et al.*, 2008).

O modo de reprodução foi determinado para a maioria dos acessos conservados no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. A análise de sacos embrionários, através de microscopia com contraste de interferência, revelou que acessos classificados como sexuais sempre apresentaram sacos meióticos ou estéreis, mas nunca sacos apomíticos. Acessos apomíticos, no entanto, apresentaram sacos apospóricos, simples ou múltiplos, e porcentagens variáveis de sacos meióticos (Valle *et al.*, 2008). Estes resultados revelaram fontes de sexualidade para *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, dentre outras espécies de menor valor agrônomo imediato (Cançado, 2009). O modo de reprodução por apomixia encontrado no gênero será discutido em detalhes posteriormente nesta revisão.

Diversos estudos de contagem cromossômica e do comportamento meiótico em acessos e híbridos de *Brachiaria* foram realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual de Maringá. Esses estudos revelaram a ocorrência de inúmeras anormalidades, como: migração precoce dos cromossomos para os pólos nas metáfases e retardatários, levando à formação de micronúcleos que permanecem nas tétrades; fusões nucleares, dando origem a sincícios; e falhas na citocinese, que podem originar gametas não reduzidos ($2n$) ao final do ciclo meiótico (Adamowski *et al.*, 2007; Mendes-Bonato *et al.*, 2002; 2006a; b; c; Utsunomiya *et al.*, 2005; Risso-Pascotto *et al.*, 2006a; Felismino *et al.*, 2006; Gallo *et al.*, 2007). A formação de univalentes e multivalentes na diacinese (metáfase I) pode levar à formação de gametas com números cromossômicos não balanceados (Valle, 2007), e foi observada em vários estudos em *Brachiaria* (Valle *et al.*, 2008). Ainda, alguns estudos apresentaram evidências citológicas de hibridização natural (Mendes *et al.*, 2006;

Boldrini *et al.*, 2010) e de alopoliploidização (Risso-Pascotto *et al.*, 2006b; Boldrini *et al.*, 2009a; Nielen *et al.*, 2010).

O comportamento meiótico de híbridos interespecíficos *B. brizantha* x *B. decumbens* mostrou altas frequências de anormalidades meióticas relacionadas à segregação irregular de cromossomos, típica de poliplóides (Adamowski *et al.*, 2008; Felismino *et al.*, 2008a; 2008b; Fuzinato *et al.*, 2007a; 2007b; 2008; Mendes-Bonato *et al.*, 2004; 2006b; 2006c; 2007; Risso-Pascotto *et al.*, 2004a; 2004b; 2005). Souza-Kaneshima *et al.* (no prelo) também encontraram irregularidades na meiose de híbridos intra-específicos de *B. humidicola*.

Todos estes trabalhos de citogenética têm contribuído para entender melhor a evolução do genoma dentro do gênero e para a escolha de genitores para a realização de cruzamentos dentro do programa de melhoramento de braquiárias. Além disso, problemas na divisão celular na meiose comprometem a viabilidade do pólen e a produção de sementes nos híbridos, informações importantes para o desenvolvimento de uma cultivar (Valle *et al.*, 2008).

Brachiaria humidicola

Conhecida também como Quicuío-da-Amazônia ou *Koroniviagrass*, a espécie *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick (sinônimo *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga) é originária do sudeste da África, onde ocorre naturalmente em áreas relativamente úmidas, de drenagem deficiente ou com inundações sazonais (Keller-Grein *et al.*, 1996). Assim, esta é uma das poucas espécies que podem ser usadas em áreas úmidas no Brasil, sendo extensamente cultivada na região amazônica, no pantanal e em áreas de alagamento no cerrado brasileiro (Serrão, 1977).

Recentemente, esta espécie, assim como outras do gênero, foi transferida para o gênero *Urochloa* (Morrone & Zuloaga, 1992). Optou-se por manter o nome *Brachiaria humidicola* para este trabalho dado seu reconhecimento mundial por mais de cem anos e pelo seu uso comercial e científico no Brasil.

As duas cultivares em uso são de lento estabelecimento e pouco exigentes em relação ao solo, apresentando bom comportamento em solos de textura, fertilidade e acidez variáveis. Suporta solos encharcados e se adapta bem a regiões inclinadas, sendo recomendadas para o controle de erosões. São tolerantes à geada, apresentam baixa qualidade de forragem e dormência prolongada nas sementes, o que acarreta problemas de germinação e estabelecimento (Pupo, 1980; Alcântara & Bufarah, 1992; Peters *et al.*, 2003). Seu valor nutritivo é menor quando comparado a outras espécies de *Brachiaria* e são tolerantes, mas não resistentes às cigarrinhas-das-pastagens (Kelemu *et al.*, 1995).

B. humidicola é uma espécie perene, estolonífera e rizomatosa, que forma uma densa cobertura do solo e pode atingir 1m de altura. Apresenta colmos vegetativos prostrados ou arqueados na parte inferior, enraizando a partir dos nós inferiores. Os colmos reprodutivos são eretos (20-60 cm de altura). As folhas são lanceoladas (com 5-16 mm de largura e até 30 cm de comprimento; com média de 12 cm ou menos), glabras ou esparsamente pilosas, com margens espessadas e miudamente serrilhadas. As bainhas foliares carecem de pilosidades. As inflorescências são terminais e racemosas, apresentando de 2-5 racemos pilosos, em forma de espícula, amplamente espaçados em um eixo central. As espiguetas são longas (4,5-5,5 mm de comprimento), pilosas, verdes manchadas de roxo e estão dispostas em duas fileiras ao longo de cada lado de um eixo estreito e angulado (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 03 de novembro de 2010; Smith *et al.*, 1982; Assis, 2001).

A espécie está relativamente bem representada no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, com 58 acessos dos 64 acessos da coleção do CIAT (Valle *et al.*, 2008). Desses 58 acessos, 42 foram caracterizados morfológicamente por Assis (2001) e Assis *et al.* (2003) e somente um é sexual natural e hexaplóide, o H031, representando a única fonte de sexualidade do germoplasma. Dessa forma, os cruzamentos na espécie devem ser feitos sempre entre este acesso (como fonte de sexualidade) e um acesso apomítico, também hexaplóide.

B. humidicola é uma espécie poliplóide e apomítica. Estudos citológicos realizados em acessos do banco de germoplasma de *B. humidicola* revelaram a existência de acessos $2n = 36$, 42 e 54 cromossomos (Maria Suely Pagliarini, comunicação pessoal). O número básico de cromossomos para esta espécie foi recentemente descrito como $x = 6$ por Boldrini *et al.* (2009a; 2009b). Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que o acesso apomítico H030 é um alopoliplóide que resultou de um processo de hibridização onde um genitor masculino apomítico hexaplóide ($2n=6x=36$) contribuiu com gametas não-reduzidos $n=36$, enquanto um genitor feminino diplóide sexual ($2n=2x=12$) contribuiu com $n=6$. Além disso, sugere-se que eventos de poliploidização levaram à formação do acesso sexual hexaplóide H031. Detalhes do comportamento meiótico de acessos de *B. humidicola* podem ser obtidos em Adamowski *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2007; Boldrini *et al.*, 2006a; 2006b; 2009a; 2009b; 2010; Calisto *et al.*, 2008).

Como parte do programa de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte - Campo Grande/MS, um cruzamento intraespecífico entre o acesso sexual BH031 (materno) e a cultivar apomítica BRS Tupi (paterno) de *B. humidicola*, ambos hexaplóides ($2n=6x=36$), foi realizado pela pesquisadora Cacilda Borges do Valle (Embrapa Gado de Corte, comunicação pessoal). Indivíduos da progênie F_1 obtida com este cruzamento foram utilizados neste estudo como população de mapeamento genético da espécie. Esta população apresenta 364 indivíduos F_1 , sendo que 279 destes indivíduos são híbridos. A identificação dos híbridos

foi feita através de marcadores RAPD por Chiari *et al.* (2007a). Alguns desses híbridos foram analisados quanto ao comportamento meiótico e foram encontradas diversas anormalidades, incluindo a formação de micronúcleos, a existência de cromossomos retardatários e a ausência de citocinese (Souza-Kaneshima *et al.*, no prelo).

As cultivares de *B. humidicola* existentes atualmente são (Miles, 2004; Valle *et al.*, 2010):

- Tully ou Humidicola Comum: lançada em 1981, originária da África do Sul e cultivada mundialmente.
- Llanero: lançada em 1987 pelo ICA (Colombian Agriculture and Livestock Institute), originária do Zâmbia.
- BRS Tupi: a ser lançada em 2011 pela Embrapa Gado de Corte e é originária do Burundi.

POLIPLÓIDES

A poliploidia caracteriza-se pela presença de três ou mais conjuntos de cromossomos em um organismo (Grant, 1981). É uma característica muito comum em plantas, com estimativas de ocorrência entre 35% (Stebbins, 1971) e 80% (Leitch & Bennet, 1997) das angiospermas, e desempenha um papel importante na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas (Schifino-Wittmann, 2004, Tate *et al.*, 2005).

Os poliplóides são tradicionalmente classificados como autopoliplóides, os quais são originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopoliplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, geralmente após um evento de hibridização. Estes termos foram cunhados por Kihara & Ono (1926), entretanto, a natureza claramente produz um contínuo de níveis de poliploidia que se originaram por meio de uma gama de processos e que

desobedecem à classificação em um desses dois tipos de poliploidia (Tate *et al.*, 2005). Stebbins (1947, 1950) reconheceu quatro tipos de poliploidia com base em critérios genéticos e citogenéticos, sendo eles: autopoliplóides, alopólíplóides segmentares, alopólíplóides verdadeiros e autoalopoliplóides. Características de cada tipo estão na Tabela 1, adaptada de Tate *et al.* (2005).

Os mecanismos de formação dos poliplóides têm sido extensamente estudados, entretanto, os mecanismos exatos de sua origem ainda permanecem pouco entendidos. São descritos dois principais mecanismos para a formação de poliplóides: duplicação do genoma, tanto nos zigotos como em células somáticas, considerados eventos raros (Tate *et al.*, 2005), e a formação de gametas não reduzidos, muito comuns em plantas e descritos para várias espécies (Harlan & De Wet, 1975). Ainda, Soltis & Soltis (1995; 1999) demonstraram que muitas espécies poliplóides conhecidas tiveram origens múltiplas, tendo o evento de poliploidização ocorrido múltiplas vezes, com participação de ancestrais variados. Acredita-se que os triplóides tiveram um papel importante na origem dos poliplóides, pois ainda que com reduzida fertilidade, muitos triplóides apresentam um certo grau de fertilidade, servindo como uma ponte entre diplóides e níveis de ploidia superiores (Ramsey & Schemske, 1998; Schifino-Wittmann, 2004). Muitas vezes o caminho evolutivo da poliploidia em algumas espécies não é bem definido por ausência dos diplóides ancestrais, devido à extinção dos mesmos ou ao fato destes não serem conhecidos e, também, pode ser que haja ausência de relações filogenéticas que possam determiná-los, permanecendo, então, desconhecida a origem da poliploidia naquela espécie.

Poliplóides são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não são bem sucedidos (De Wet, 1980). Em relação à persistência e estabelecimento dos poliplóides entre os progenitores diplóides, existem duas hipóteses: um novo poliplóide persiste ao substituir o(s) parental(is) diplóide(s) ou o novo poliplóide coexiste

com seu(s) parental(ais) diplóide(s). Inúmeros estudos sugerem evidências da diferenciação de habitats entre citotipos de uma espécie. No geral, a grande variabilidade dos poliplóides para

Tabela 1. Sumário dos tipos tradicionais de poliplóides. A e B representam os diferentes genomas dos parentais e os subscritos indicam genomas distintos da mesma espécie. Adaptado de Tate *et al.* (2005)

Tipo de poliploidia	Modo de formação	Pareamento cromossômico e herança	Exemplo de constituição genômica
Autopoliploidia	Dentro de uma espécie, tanto pela duplicação de um genoma em um único indivíduo ou pela fusão de gametas não-reduzidos de indivíduos geneticamente similares	Multivalentes, polissômica	AAAA
Autopoliploidia interracial	Dentro de uma espécie, cromossomos geneticamente distintos mas estruturalmente similares	Multivalentes, polissômica	AAAA
Alopoliploidia segmentar	Dentro de uma espécie, mas com genomas parentais que diferem entre si em muitos genes ou segmentos cromossômicos; estes são poliplóides instáveis que evoluem em direção de uma autopoliploidia ou alopoliploidia verdadeira	Bivalentes, dissômica ou multivalentes, polissômica	$A_sA_sA_tA_t$
Alopoliploidia verdadeira	Hibridização entre espécies distantes relacionadas	Bivalentes, dissômica	AABB
Autoalopoliploidia	Duplicação genômica a partir de uma formação alopoliplóide	Multivalentes e bivalentes; alguns locos são dissômicos, outros, polissômicos	AAAABB

características fenotípicas, demográficas e morfológicas em relação aos progenitores diplóides contribuem para a diferenciação do habitat entre os citotipos (Tate *et al.*, 2005).

A poliploidia apresenta impactos significativos ao nível celular, fisiológico e ecológico. Poliplóides apresentam, muitas vezes, células maiores em relação aos seus diplóides ancestrais, que podem provocar um aumento de tamanho da planta como um todo (“efeito giga”) (Stebbins, 1950). Além disso, a poliploidia causa efeitos variados em processos fisiológicos, ainda sem padrões bem definidos para as plantas em geral, e pode ter efeitos profundos na interação com animais herbívoros e polinizadores, com diferenças significativas quando comparamos o comportamento destes animais em plantas diplóides e poliplóides (Tate *et al.*, 2005).

A apomixia é uma característica freqüente em plantas poliplóides, sendo a apomixia esporófitica o tipo mais comum associado à poliploidia (Pessino *et al.*, 1999). Nogler (1984) sugere que os genes dominantes para a apomixia devem estar ligados à recessivos letais que se expressam normalmente na geração do gametófito (haplóide). Nos poliplóides, esses recessivos letais não seriam expressos devido à natureza “diplóide” do gametófito. A apomixia representa um escape à esterilidade ao mesmo tempo em que confere uma melhor adaptação em ambientes particulares (Briggs & Walters, 1997), o que é confirmado pela condição facultativa e não obrigatória da apomixia na maioria dos poliplóides (Asker & Jerling, 1992). O entendimento do controle genético da apomixia, particularmente em poliplóides, pode resultar em aplicações práticas, especialmente na agricultura (Tate *et al.*, 2005)

A poliploidia também apresenta impactos significativos na estrutura, organização e composição do genoma. Alterações no genoma envolvem mecanismos genéticos (inserções e deleções, duplicações, aneuploidia, recombinação homeóloga, crossing-over desigual e ativação de transposons) e epigenéticos (metilação do DNA, modificação de histonas, interferência por RNA e compensação na dosagem dos alelos), sendo os últimos mecanismos herdáveis, e capazes de alterar a expressão gênica sem afetar a seqüência de DNA e apresentar efeitos fenotípicos dramáticos (Tate *et al.*, 2005). Além disso, observa-se com

freqüência a reestruturação do genoma do poliplóide, que passa a se comportar como diplóide, o que é conhecido como diploidização. Ocorre a regularização do pareamento dos cromossomos na meiose com formação exclusiva, ou quase, de bivalentes, e a herança gênica tende a passar de poli- para dissômica, tanto em auto- como em aloploplóides (Levin, 2002; Schifino-Wittmann, 2004).

No estudo de marcadores mendelianos em poliplóides deve-se considerar o comportamento dos cromossomos no momento da meiose. Podemos distinguir dois casos extremos: (1) formação de bivalentes e herança dissômica, que compreende principalmente os aloploplóides, que possuem dois genomas diferentes com muitos locos em comum; (2) formação de multivalentes e herança polissômica, na qual os cromossomos se pareiam ao acaso dentro de uma classe de homologia, que compreende principalmente os autoploplóides (Stebbins, 1950; Jannoo *et al.*, 1999). Deste modo, enquanto que os tipos de pareamentos bivalente e multivalente representam dois extremos, diversas espécies representam estágios intermediários formados pela combinação dos dois comportamentos meióticos. As evidências indicam que estas situações devem ser descritas por um modelo geral de herança poliplóide em que não haja preferência por pareamento homólogo ou homeólogo. O grau de ocorrência de pareamento homólogo sobre pareamento homeólogo é geralmente descrito como “fator de pareamento preferencial”, e pode ser medido a partir da freqüência de multivalentes (De Silva *et al.*, 2005). Assim, alguns poliplóides apresentam uma mistura de tipos de pareamento cromossômico durante a meiose e herança dissômica e polissômica ao mesmo tempo (Stebbins, 1950).

A indução de poliploidia pode ser uma ferramenta importante no programa de melhoramento genético de algumas espécies, apresentando três finalidades básicas: poliploidização de um híbrido para restauração da fertilidade do mesmo ou a fim de sintetizar uma nova espécie, poliploidização a fim de obter uma planta maior e melhor (“efeito giga”) ou

poliploidização para transpor a barreira imposta por níveis de ploidia diferentes e permitir o cruzamento intra- ou interespecífico (Dewey, 1980). A poliploidização pode ser via sexual ou somática (Valle *et al.*, 2008). Geralmente é feita a poliploidização somática por meio do uso da colchicina para a duplicação do genoma (Blakeslee & Avery, 1937), mas podem ser utilizados outros agentes antimitóticos, como o óxido nitroso. Em *B. ruziziensis* (Swenne *et al.*, 1981; Gobbe *et al.*, 1981), *B. decumbens* (Simioni & Valle, 2009) e *B. brizantha* (Pinheiro *et al.*, 2000), foram obtidos tetraplóides sexuais induzidos por colchicina, permitindo a realização de cruzamentos intra- e interespecíficos, representando uma importante ferramenta para o melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*.

MARCADORES MOLECULARES

A era dos marcadores moleculares se iniciou na década de 1960 com a técnica de eletroforese de isoenzimas, que se baseia na detecção de mutações no código genético através da alteração na carga elétrica de enzimas em decorrência da alteração da sequência de aminoácidos, gerando polimorfismo no tempo de migração das enzimas na eletroforese (Torggler *et al.*, 1995).

Com avanços de técnicas de biologia molecular, foi desenvolvido o marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), que se baseia na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem seqüências específicas no DNA e clivam a molécula nestes sítios. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem criam polimorfismos que podem ser visualizados pela diferença de tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática, sendo detectadas por meio de *Southern blotting* (Botstein *et al.*, 1980).

Com o advento da reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Mullis & Faloona, 1987), diversos marcadores moleculares baseados nesta metodologia foram desenvolvidos: AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos *et al.*, 1995), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Tautz, 1989), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Rafalsky, 2002), TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*, Hu & Vick, 2003), dentre outros. Essas técnicas baseadas em PCR abriram novas e inúmeras possibilidades de detecção e avaliação do polimorfismo encontrado na molécula de DNA.

Os marcadores moleculares são ferramentas valiosas no estudo de genomas e possui inúmeras aplicações em programas de melhoramento genético. A incorporação destes marcadores na seleção de características econômicas durante os primeiros estágios de melhoramento, assim como na escolha de melhores parentais em um cruzamento, pode reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento de novas variedades. A disponibilidade de marcadores polimórficos, que co-segregam com características agrônômicas de interesse, permite atingir estes objetivos. Um significativo progresso no estudo genético de plantas cultivadas tem sido alcançado nas últimas décadas graças a esses marcadores.

No entanto, para a realização de seleção assistida por marcadores (SAM) para características agrônômicas quantitativas, é necessário um longo caminho. A SAM fundamenta-se no conceito de que é possível inferir a presença de um gene a partir de um marcador fortemente ligado a este. Quando o marcador se encontra muito longe da região de interesse, a probabilidade de haver recombinação entre o marcador e o gene é maior, reduzindo a possibilidade de ambos serem transmitidos aos indivíduos da progênie. Dessa forma, a existência de um marcador bem próximo à característica de interesse é pré-requisito neste tipo de seleção (Kumar, 1999). A construção de um mapa de QTL's (*Quantitative Trait*

Loci) requer a elaboração preliminar de um mapa de ligação, que vai fornecer a estrutura física para a alocação dos QTL's (Ball *et al.*, 2010).

Marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR)

Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*, Tautz, 1989; Weber & May, 1989) são combinações de uma a seis bases repetidas em *tandem*, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos (Litt & Luty, 1989). A natureza de sua variação é o número de repetições das unidades repetidas que o compõem. Os microssatélites encontram-se flanqueados por seqüências únicas conservadas entre genótipos de uma mesma espécie e de espécies relacionadas, podendo então ser transferidos dentro de espécies do mesmo gênero ou de gêneros filogeneticamente próximos (Goldstein & Schlotterer, 2001). São considerados marcadores moleculares co-dominantes, pois permitem a distinção entre homocigotos e heterocigotos dentro de um mesmo loco.

Além de apresentar um padrão de herança mendeliana, essas regiões são multialélicas, altamente polimórficas e informativas. O alto polimorfismo encontrado deriva de variações no número de repetições, que podem ser provenientes do deslize (*strand - slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA ou do pareamento errôneo (*crossing-over* desigual) entre cromátides irmãs (Schlotterer & Tautz, 1992). A amplificação dessas regiões é realizada via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando iniciadores (*primers*) específicos e complementares às regiões que flanqueiam essas repetições. A detecção do polimorfismo pode ser realizada em géis desnaturantes de poliacrilamida por meio de marcação radioativa ou corados com prata, e por marcação dos produtos amplificados com compostos fluorescentes (Rafalsky *et al.*, 1996; Creste *et al.*, 2001). Os microssatélites podem ser isolados através da construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, usando sondas complementares

aos motivos (Billotte *et al.*, 1999), e o posterior seqüenciamento dos clones e desenho de *primers* específicos.

Todas essas características dos SSR os tornaram um marcador extensamente utilizado para mapeamento genético de genomas, fazendo análises de ligação e associação de locos a características de interesse, para identificação e discriminação de genótipos, como cultivares, para estudos de genética de populações, para a caracterização do modo de reprodução, para a quantificação do fluxo genético, identificação e quantificação de diversidade genética, tanto de bancos de germoplasma como de populações naturais, e na SAM (Borém & Caixeta, 2006; Collevatti *et al.*, 2001; Olufowote *et al.*, 1997; Van Oosterom & Ceccarelli, 1993; Wu & Tanksley, 1993). Todas estas aplicações dos SSRs permitem gerar informações importantes para os programas de melhoramento genético, podendo reduzir o tempo de desenvolvimento de uma cultivar.

Deteção do polimorfismo por meio de marcadores moleculares em poliplóides

Uma vez identificada a poliploidia e entendidas as dificuldades de se trabalhar com estes organismos complexos, podemos pensar na deteção do polimorfismo em poliplóides por meio do estudo de marcadores moleculares co-dominantes, como os microssatélites (SSRs). Estes marcadores são considerados co-dominantes, pois permitem a identificação dos heterozigotos para o loco em questão. A existência de grande disponibilidade desses marcadores ao longo do genoma abriu perspectivas para estudos genéticos, entre eles, a possibilidade da construção de mapas genéticos. No entanto, em organismos poliplóides, são gerados muitos fragmentos em um mesmo loco, os quais podem representar os diferentes alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos envolvidos. Isso não permite a dosagem exata da quantidade de alelos, não permitindo então a identificação dos genótipos

pelo fenótipo visualizado. Assim, o polimorfismo é representado pela ausência ou presença de bandas individuais dentro de um mesmo loco, as quais não se podem denominar alelos, já que uma banda representa um ou mais alelos de um loco.

Alguns estudos foram realizados na tentativa de estimar a frequência alélica em poliplóides. Esselink *et al.* (2004) descrevem uma metodologia para determinar a configuração alelica de locos microssatélites utilizando o método MAC-PR (*microsatellite DNA allele counting-peak ratio*), entretanto, o mesmo deve ser utilizado com cautela por apresentar algumas limitações. Abordagens estatísticas também foram desenvolvidas por De Silva *et al.* (2005), que descrevem um algoritmo EM para estimar as frequências alélicas, e por Obbard *et al.* (2006), que desenvolveram um método estatístico para medir a diversidade genética de populações de alopoliplóides a partir da análise dos padrões de bandas (fenótipos alélicos) e uma subsequente análise estatística refinada. No entanto, ambas as abordagens apresentam limitações, muitas vezes podendo ser utilizadas somente em tipos específicos de poliploidia e pareamento cromossômico. Ainda, para tetraplóides, Thrall & Young (2000) e Luo *et al.* (2006) descrevem outras abordagens.

Para o mapeamento genético, Wu *et al.* (1992) propõem uma metodologia em que é considerado o pareamento de bivalentes na meiose e pode ser utilizada para qualquer nível de ploidia. Dessa forma, o mapeamento genético é realizado por meio de fragmentos de dosagem única no genoma, denominados marcadores em dose única (MDU) ou SDRF (Single Dose Restriction Fragment) detectados pela segregação na proporção 1:1. As marcas presentes nos parentais do cruzamento são identificadas e a genotipagem da população de mapeamento é feita por meio da identificação das bandas dos parentais nos indivíduos da progênie, configurando, então, um marcador dominante. No caso de segregação 1:1, isso não representa nenhuma desvantagem. Um MDU é equivalente a um único alelo em autopoliplóides, ou a um alelo no estado heterozigoto em um genoma diplóide ou alopoliplóide. Sua segregação

equivale a um alelo simples ou no estado de heterozigoto nos gametas: metade dos gametas contém o DNA de um fragmento e a outra metade não. Estes tipos de gametas podem ser visualizados na progênie de um determinado cruzamento, onde tal fragmento está presente em um parental e ausente no outro. Assim, o fenótipo dos marcadores MDU representa o tipo de gameta de um parental ao invés de apresentar a combinação dos gametas de ambos (Wu *et al.*, 1992; Oliveira 2007).

Outras segregações podem ser observadas nos poliplóides. A presença de uma marca em ambos os genitores, quando representar apenas um alelo, segrega na progênie na proporção 3:1 e pode ser utilizada no mapeamento genético (Da Silva, 1993b; Grivet *et al.*, 1996). Ainda, se considerarmos níveis de poliploidia específicos, pode-se considerar mais algumas razões de segregação, como 4:1 e 19:1 em hexaplóides (Ripol *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1992), mas sua utilização vai depender do tamanho da população de mapeamento, que deve ser grande o suficiente para identificar essas razões com confiança estatística, e da disponibilidade de métodos estatísticos específicos, ainda em desenvolvimento.

Wu *et al.* (1992) calcularam que para considerar um marcador como MDU com 95, 98 e 99% de nível de significância são necessários 54, 75 ou 92 indivíduos constituindo a família a ser estudada. Tanto para auto como para alopoliplóides, a detecção de ligação em fase de acoplamento de MDUs é uma função da fração de indivíduos recombinantes em uma população. Esses marcadores permitem a identificação de alelos em uma população relativamente pequena.

Marcadores moleculares no gênero *Brachiaria*

Apesar de diversos tipos de marcadores moleculares terem sido amplamente desenvolvidos para outras espécies de interesse comercial, poucos, porém importantes, foram

os avanços obtidos para gramíneas do gênero *Brachiaria*. Isoenzimas foram utilizadas na detecção de híbridos de *Brachiaria* (Lapointe & Miles, 1992; Cruz *et al.*, 1989; Hacker, 1988) e na caracterização de 416 acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* pertencentes à coleção de germoplasma do CIAT (Keller-Grein *et al.*, 1996). Marcadores RFLP e AFLP foram utilizados por Pessino *et al.* (1997; 1998) para a identificação de marcadores ligados à apomixia em uma população de híbridos inter-específicos de *B. ruziziensis* X *B. brizantha* cv. Marandu. Jamnadass *et al.* (2006) utilizaram marcadores AFLP e RAPD no estudo da diversidade genética de genótipos selvagens de *Brachiaria xantholeuca*, a fim de identificar genótipos adaptados que poderiam ser usados na recuperação de áreas degradadas. Ambiel *et al.* (2008); Chiari *et al.* (2007b; 2008) e Bonato *et al.* (2002) utilizaram marcadores RAPD para acessar a diversidade genética de espécies de *Brachiaria* do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Zorzatto *et al.* (2010) encontraram um RAPD associado à aposporia em híbridos intra-específicos de *B. humidicola*, que futuramente deve ser transformado em um marcador SCAR e ser incorporado ao programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu os primeiros SSRs para *Brachiaria brizantha* (Jungmann *et al.* 2009a) e *B. humidicola* (Jungmann *et al.* 2009b – Capítulo I).

MAPEAMENTO GENÉTICO

Mapas genéticos gerados a partir de marcadores moleculares são ferramentas importantes para diversos estudos genéticos, desde o estudo de arquitetura e evolução genômicas, como os rearranjos genéticos intra- e interespecíficos, dentro e entre

cromossomos, a anotação e clonagem de genes, até o mapeamento de QTLs em várias espécies (Alwala *et al.*, 2008; Ball *et al.*, 2010).

O princípio básico para o mapeamento genético foi desenvolvido por Sturtevant (1913), o qual utiliza a porcentagem de recombinantes como indicador quantitativo da distância linear entre dois genes. Os mapas desta época mostravam que a posição dos genes correspondia à sua ordem linear nos cromossomos (Gardner & Snustad, 1986; Griffiths *et al.*, 1998).

A frequência de recombinação entre dois locos traduz o número de *crossing-overs* produzidos entre eles durante a meiose. Dessa forma, marcadores que possuem uma frequência de recombinação maior que 50% podem pertencer a cromossomos diferentes ou estarem ligados ao mesmo cromossomo, mas muito distantes um do outro. De modo contrário, quanto menor a frequência de recombinação entre os marcadores, maior a proximidade entre os mesmos. A relação entre a frequência de recombinação (distância genética) e o número de nucleotídeos separando dois marcadores (distância física) é variável. Então a frequência de recombinação é traduzida em distância genética, através de funções específicas, que assumem, ou não, a interferência de *crossing-overs* adjacentes (Liu, 1998), sendo as mais comuns as de Haldane (Haldane, 1919) e a de Kosambi (Kosambi, 1944).

O mapa é construído em três passos: a verificação da segregação dos marcadores, agrupamento e ordenação dos marcadores. A segregação dos marcadores pode ser analisada através do teste de aderência de Qui-quadrado ou através do LOD *score* (Mather, 1957; Morton, 1955), testando se as marcas seguem as segregações esperadas para a população em questão. Os marcadores que seguem as segregações esperadas são então utilizados para a construção de grupos de ligação (LG), onde cada LG é definido biologicamente como um grupo de genes com os locos no mesmo cromossomo, e estatisticamente, como um grupo de locos com herança conjunta de acordo com determinados critérios estatísticos (Liu, 1998). Por

fim, a ordem dos marcadores dentro de um grupo de ligação é determinada através de diferentes métodos estatísticos, os quais podem ser estudados em detalhes em Carneiro & Vieira (2002) e Mollinari *et al.* (2009), e escolhidos de acordo com o tipo de marcador, porcentagem de dados faltantes e tamanho da população de mapeamento.

O pré-requisito para a construção de um mapa de ligação é a obtenção de uma população segregante e os parentais desta população devem possuir características importantes contrastantes entre si. As populações de mapeamento mais usuais são F_2 , retrocruzamentos e RILs (*Recombinant Inbred Lines*). Entretanto, todos esses tipos de população são originários de linhagens endogâmicas, as quais não podem ser obtidas em espécies com auto-incompatibilidade, depressão endogâmica ou longo ciclo de vida, como no caso de espécies arbóreas. A fim de superar estes problemas, Grattapaglia & Sederoff (1994) propuseram a utilização de uma estratégia, denominada *pseudo-testcross*, que permite a construção de mapas de ligação com base em uma progênie F_1 de genitores heterozigotos. Para *B. humidicola*, a reprodução por apomixia impede o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, tornando necessário o mapeamento em uma progênie de irmãos-completos.

Vários softwares foram desenvolvidos para a construção de mapas genéticos nas situações descritas acima. Alguns deles são o Map-Maker/EXP (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1993), o MapManager QTX (Manly *et al.*, 2001) e o JoinMap (Stam, 1993).

Um dos problemas da abordagem de *pseudo-testcross* é a obtenção de dois mapas genéticos diferentes (um para cada genitor), pois são usados apenas marcadores com segregação 1:1, ou seja, marcadores que apresentam polimorfismo em apenas um dos pais. Apenas com esse tipo de marcador é impossível que os mapas dos dois genitores sejam integrados. A integração desses mapas é de extrema importância, pois muitos dos efeitos genéticos importantes para o melhoramento de plantas (dominâncias e epistasias) só são

possíveis de serem estimados em um mapa integrado. A construção de mapas genéticos integrados em populações de irmãos completos originadas do cruzamento de dois genitores heterozigóticos foi feita por vários estudos, como o de Maliepaard *et al.* (1997). No entanto, um fator limitante destes métodos é a dificuldade de caracterizar as fases de ligação corretamente. Recentemente, Garcia *et al.* (2006) e Oliveira *et al.* (2007) construíram mapas genéticos integrados de cana-de-açúcar por meio da metodologia proposta por Wu *et al.* (2002). Para a construção de mapas integrados podemos destacar o software JoinMap (Stam, 1993), que se baseia em um LOD modificado em função de um teste de Qui-quadrado independente, permitindo, assim, a integração de marcadores de diferentes tipos de segregação em mapas genitores e a construção de mapas consensos, e o software OneMap (Margarido *et al.*, 2007) que é um programa de código livre e trabalha com estimativas de máxima verossimilhança através de cadeias de Markov ocultas, as quais são muito eficientes em termos de lidar com informações de marcadores ligados (Mollinari *et al.*, 2009). Este software é capaz de estimar a fase de ligação dos marcadores, informações importantes para a posterior estimativa dos efeitos genéticos quando do mapeamento de QTLs.

Mapeamento genético em poliplóides

A construção de mapas genéticos em organismos poliplóides é um desafio por algumas razões: (1) espera-se um grande número de genótipos possíveis em uma população segregante dada a grande quantidade de alelos combinando entre si em determinado nível de ploidia do genoma; (2) o genótipo de um indivíduo nem sempre pode ser inferido a partir de seu fenótipo molecular (Cervantes-Flores *et al.*, 2008) e; (3) o tipo de poliploidia (autopoliploidia ou alopoliploidia) de muitas espécies não é definido, dificultando a determinação de padrões

esperados de segregação para serem assumidos na construção do mapa (Ripol *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1992). Para espécies autopoliplóides, cromossomos correspondentes nas diferentes cópias do genoma são homólogos, assim, podem parear randomicamente entre si. Para alopólplóides, os cromossomos se originam de dois ou mais genomas diferentes, pareando-se preferencialmente aos seus homólogos do mesmo genoma durante a meiose, e em menor frequência a um cromossomo homeólogo (Ramsey & Schemske, 2002; Sybenga, 1996).

O desenvolvimento de mapas genéticos em poliplóides se tornou possível com a análise de segregação de marcadores de dose única (MDU), proposta por Wu *et al.* (1992). MDU representa um alelo presente em uma cópia (simplex) em somente um dos parentais, configurando uma razão de segregação de 1:1, como em uma configuração *testcross*. Já que todos os genótipos não podem ser facilmente identificados pelos seus padrões de bandas, essa estratégia de mapeamento adotada para espécies poliplóides, com pareamento bivalente na meiose, permite a análise da segregação de múltiplos alelos em diferentes dosagens (Wu *et al.*, 1992). Marcadores em dose única presentes em ambos os parentais, com razão de segregação esperada de 3:1, também podem ser usados para o mapeamento genético, mas são menos informativos. Essa abordagem tem sido muito utilizada na construção de mapas genéticos em poliplóides, como em cana-de-açúcar (Oliveira *et al.*, 2007) e batata-doce (Cervantes-Flores *et al.*, 2008). Para organismos autohexaplóides, a razão esperada entre presença e ausência de marcas nos indivíduos da população são 1:1, 4:1 e 19:1, segundo Ripol *et al.* (1999). Entretanto, se torna necessário o desenvolvimento de métodos estatísticos para que se possam utilizar marcadores com estas outras segregações.

APOMIXIA

A apomixia é um processo geneticamente controlado de reprodução assexuada em plantas, onde o embrião é formado sem a união dos gametas feminino e masculino, mas com a formação de sementes férteis iguais à planta mãe (Nogler, 1984). Encontrada principalmente nas famílias Gramineae, Compositae, Rosaceae e Rutaceae, a apomixia ocorre desde algas até angiospermas, estando presente em mais de 300 espécies de plantas, em mais de 35 famílias (Gauer & Cavalli-Molina, 2000), apresentando um padrão de distribuição que indica uma origem polifilética (Asker & Jerling, 1992).

Dependendo da origem do embrião e do padrão de desenvolvimento da célula que dará origem ao embrião, a apomixia pode ser classificada em apomixia esporofítica ou gametofítica (Nogler, 1984; Gauer & Cavalli-Molina, 2000).

Na apomixia esporofítica, também chamada de embrionia adventícia, comum em espécies de *Citrus* e *Mangifera*, não há formação de sacos embrionários, mas os embriões diplóides desenvolvem-se diretamente a partir de células somáticas dos envoltórios do óvulo (Asker & Jerling, 1992; Koltunow, 1993).

A apomixia gametofítica é a mais amplamente distribuída, incluindo plantas de interesse econômico, especialmente gramíneas forrageiras incluindo os gêneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Panicum*, *Paspalum*, *Poa*, entre outras (Dall'Agnol & Schifino-Wittmann, 2005).

Na apomixia gametofítica há formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), por dois caminhos diferentes: diplosporia ou aposporia (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992). Na diplosporia, a célula-mãe da megáspora (MMC) que dará origem ao saco embrionário não sofre divisão meiótica ou sofre uma meiose incompleta, levando à formação de um saco embrionário não-reduzido. Na aposporia ocorre a ativação de uma célula nucelar somática, que é chamada de célula inicial apospórica (AI) que dá origem a um saco embrionário não-reduzido

contendo somente quatro núcleos (Carneiro & Dusi, 2002). Todos esses processos culminam na produção de sementes contendo embriões geneticamente idênticos à planta mãe. Detalhes dos processos apomíticos podem ser consultados em Nogler (1984), Asker & Jerling (1992), Koltunow (1993) e Savidan (2000).

No gênero *Brachiaria* ocorre a apomixia do tipo apospórica e a fecundação do endosperma (pseudogamia) se faz necessária (Lutts *et al.*, 1984; Ngendahayo, 1988; Valle, 1990). Além disso, podem ocorrer sacos embrionários meióticos em conjunto com sacos apospóricos (Araújo *et al.*, 2005), mas a ocorrência de pelo menos um saco embrionário apospórico configura uma apomixia facultativa (Valle, 1990). O desenvolvimento precoce dos sacos apospóricos (Dusi & Williamse, 1999; Lutts *et al.*, 1984) resulta no predomínio da reprodução apomítica, mesmo quando uma alta porcentagem de óvulos apresenta um saco embrionário derivado da meiose (Savidan, 2000). As plantas são consideradas sexuais quando não apresentarem nenhum saco embrionário apospórico (Valle & Savidan, 1996).

A apomixia está relacionada à poliploidia, enquanto que a sexualidade geralmente é encontrada no nível diplóide (Levin, 2002). No entanto, estudos recentes sobre o modo de reprodução no germoplasma de *B. humidicola* da Embrapa Gado de Corte revelaram um acesso sexual hexaplóide ($2n=6x=36$) (Boldrini *et al.*, 2009a, b).

No melhoramento vegetal, a apomixia surge como uma possibilidade de capturar e fixar o vigor híbrido, e o sucesso deste procedimento tem sido mais intenso em plantas forrageiras (Dall'Agnol & Schifino-Wittmann, 2005). Com um melhor conhecimento do mecanismo da aposporia, o melhoramento de espécies apomíticas poderá ser mais eficientemente explorado, bem como o melhoramento de espécies sexuais, por meio da introdução da apomixia em espécies de interesse (Gauer & Cavalli-Molina, 2000). Sendo assim, os métodos de melhoramento para *Brachiaria* devem ser orientados para a exploração das propriedades

especiais da apomixia, visando ao desenvolvimento de cultivares apomíticas (Pereira *et al.*, 2001). Nos cruzamentos, as plantas apomíticas são utilizadas como doadoras de pólen para a planta sexual feminina. A análise genética da apomixia é complicada devido à natureza poliplóide dos apomíticos, a incompatibilidade de ploidia de plantas sexuais e apomíticas, e a dificuldade na análise da descendência (Koltunow & Grossniklaus, 2003).

Herança da apomixia

Apesar de alguns estudos sugerirem a possível existência de um modelo de herança poligênica para a apomixia (Grimanelli *et al.*, 1998), muitos trabalhos conduzidos em diferentes espécies de plantas evidenciam a base genética simples da apomixia, o que facilita sua manipulação em programas de melhoramento genético.

Nas gramíneas apospóricas *Pennisetum squamulatum*, *Panicum maximum* e *Brachiaria*, e nos gêneros *Ranunculus* e *Hieracium*, sabe-se que a apomixia apresenta herança simples dominante (Bhat *et al.* 2005; Ozias-Akins & van Dijk, 2007). Estudos realizados por Nogler (1984) e Savidan (1982) em *Ranunculus auricomus* e *Panicum maximum*, respectivamente, indicam que a aposporia segrega como um único fator Mendeliano dominante, a partir do qual foi estabelecido um modelo para esta herança. Assim, genótipos tetraplóides apomíticos apospóricos supostamente possuem o genótipo Aaaa carregando, junto com o alelo apomeiótico dominante A, alguns alelos recessivos para a reprodução sexual (Bhat *et al.*, 2005). Estudos realizados para *Brachiaria spp.* confirmam a herança simples dominante para a característica dentro do gênero (Miles & Escandon, 1997; Pessino *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998). Conforme apresentado por Miles & Valle (1996) para *Brachiaria*, os resultados são indicativos de herança tetrassômica monogênica, com a apomixia dominante sobre a sexualidade, em concordância com o que havia sido determinado para *P. maximum* (Savidan,

1982). Assim, a segregação observada num cruzamento de plantas sexuais e apomíticas resulta numa proporção de híbridos sexuais e apomíticos próxima de 1:1, enquanto autopolinização de sexuais ou cruzamentos entre sexuais, sempre produz progênes sexuais indicando recessividade da sexualidade.

Bitencourt *et al.* (2007) utilizaram análises citoembriológicas para determinar o modo de reprodução em uma progênie de irmãos-completos de *B. humidicola*, a mesma utilizada neste trabalho. Os resultados sugerirem que a apomixia nessa espécie segue esse mesmo modelo monogênico de herança.

Determinação de modo de reprodução em *Brachiaria*

O modo de reprodução de uma planta é determinado pelo processo de formação do saco embrionário, ou megagametogênese. Para avaliar o modo de reprodução de uma planta, podem ser feitas avaliações morfológicas em teste de progênie, análise de ovários em microscopia (por corte e coloração ou clareamento), citometria de fluxo, teste com auxina, métodos bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (Valle *et al.*, 2004a).

Tradicionalmente, o teste de progênie representa a forma mais simples de detecção, onde a uniformidade fenotípica denota a origem apomítica, e a heterogeneidade indica recombinação, portanto sexualidade. Entretanto, é um procedimento que apresenta limitações quanto ao tempo e espaço físico que ocupa, além de problemas na identificação do grau de apomixia, ou seja, apomixia facultativa (Valle *et al.*, 2004a).

A metodologia de clarificação do ovário e visualização por microscopia de fase por interferência (Crane & Carman, 1987; Herr, 1971; Young *et al.*, 1979) viabilizou uma identificação mais eficiente do modo de reprodução, ainda que laboriosa. O método consiste na

coleta de flores em antese e extração de ovários; clarificação destes com salicilato de metila e análise por microscopia de contraste de interferência (Miles & Valle, 1996). Na prática, duas lâminas com cerca de 30 ovários/lâmina são analisadas e o aparecimento de sacos apospóricos simples ou múltiplos indica apomixia (Valle & Savidan, 1996).

Entretanto, todos os procedimentos citados até o momento necessitam aguardar o ciclo completo de crescimento da planta, pois envolvem a observação de características na planta adulta, ou a coleta e fixação de flores recém abertas, o que leva muito tempo. A interpretação dos resultados de microscopia requer treinamento específico e a identificação da anatomia dos sacos embrionários por contraste de interferência é um trabalho criterioso e demorado. Além disso, esta técnica é viável somente nos casos em que a estrutura do ovário é morfologicamente distinta do ovário meiótico, como acontece na aposporia do tipo *Panicum*, comum no gênero *Brachiaria*. Neste caso, o saco embrionário contém apenas quatro núcleos: a oosfera, um núcleo polar e duas sinérgides, enquanto o saco tipo *Polygonum* (meiótico) contém os oito núcleos tradicionais: a oosfera, duas sinérgides, dois núcleos polares e três antípodas.

Essas dificuldades podem ser vencidas com a utilização de marcadores moleculares que co-segregam com a apomixia, pois não dependem do crescimento e florescimento da planta para a identificação do modo de reprodução, que pode ser feito a partir de sementes ou plântulas. Entretanto, é preciso buscar esse(s) marcador(es) em populações específicas (Leblanc & Mazzucato, 2001) e avaliar se este(s) funcionaria(m) em outras populações. De qualquer forma, contribuem significativamente para programas de melhoramento nos quais são necessárias triagens rápidas de populações numerosas.

Mapeamento genético da apomixia

Há um grande interesse em localizar o(s) loco(s) relacionado(s) à apomixia, tanto para estudá-lo geneticamente como para clonar o(s) gene(s) responsável(is) por este modo de reprodução. Estudos de mapeamento genético do(s) gene(s) da apomixia, bem como estudos citogenéticos, de mapeamento físico, de expressão gênica e de sintonia entre sequências têm sido extensamente realizados para gramíneas forrageiras. Trabalhos desenvolvidos para diferentes espécies de *Paspalum* englobam vários aspectos dos estudos genéticos da apomixia, desde o estudo da herança da característica (Stein *et al.*, 2004), do mapeamento comparativo revelando a sintonia do loco da apomixia em espécies de *Paspalum* (Pupilli *et al.*, 2004) e de estudos citogenéticos (Calderini *et al.*, 2006), até a construção do mapa genético a partir de marcadores moleculares por Stein *et al.* (2007) e estudos de expressão gênica relacionada à apomixia do tipo aposporia (Laspina *et al.*, 2008). Para *Panicum maximum*, Ebina *et al.* (2005) encontraram marcadores que co-segregam com a aposporia e Yamada-Akiyama *et al.* (2009) encontraram três genes possivelmente relacionados à essa característica por meio da análise de sequências expressas (ESTs). Para *Pennisetum ciliare*, foi identificado um grupo de ligação incluindo o gene da apomixia (Gustine *et al.*, 1997).

Para *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris*, ambas gramíneas que se reproduzem por aposporia, muitos estudos foram realizados. Em *Pennisetum* foram encontrados dois marcadores, um RFLP e um RAPD ligados à aposporia (Ozias-Akins *et al.*, 1993). Já em 1998, Ozias-Akins e colaboradores mapearam uma região genômica ligada à aposporia em *Pennisetum squamulatum*, denominando-a de *Apospory-Specific Genomic Region* (ASGR). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa caracterizou molecularmente a ASGR para as duas espécies (Ozias-Akins *et al.*, 2003), mapeou fisicamente esta região (Akiyama *et al.*, 2005; Conner *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2006; Gualtieri *et al.*, 2006), analisando a

sintenia da região com outras gramíneas e refinou o mapeamento da região com marcadores moleculares baseados em retrotransposons (Huo *et al.*, 2009).

Entretanto, em *Brachiaria*, poucos estudos foram realizados nesse sentido. Em 1997, Pessino e colaboradores identificaram um grupo de ligação de milho relacionado à apomixia em *Brachiaria*, analisando por bulk segregante uma população F₁ resultante de um cruzamento inter-específico entre *B. ruziziensis* e *B. brizantha*. Os resultados obtidos revelam dois marcadores RFLP e um RAPD ligados à característica e suportam a existência de um único loco controlando a aposporia no gênero. Em 1998, Pessino e colaboradores identificaram mais marcadores associados à aposporia em *Brachiaria*, revelando um mapa genético mais detalhado do apo-loco. Foram mapeados quatro marcadores RFLPs, um RAPD e dois AFLPs ligados à característica, sendo que os marcadores PAM52-5 e PAM49-13 foram localizados, respectivamente, a 1,2cM e 5,7cM de cada lado do apo-loco. O mapa apresenta sintenia com regiões do cromossomo 2 de arroz e do cromossomo 5 de milho. Mais recentemente, Zorzatto *et al.* (2010) analisaram 100 híbridos intra-específicos de *B. humidicola*, através de bulks segregantes, encontrando um marcador RAPD a 4,6cM do apo-loco.

Estudos de expressão gênica relacionada à apomixia em *Brachiaria* têm sido realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Vera Carneiro, da Embrapa Cenargen, tendo sido identificadas algumas sequências de cDNA diferencialmente expressas em ovários de plantas sexuais e apomíticas de *B. brizantha* (Rodrigues *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2009). Os estudos avançados da ASGR em outras gramíneas fornecem informações para o desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais, como os do tipo TRAP ou SNP, para estudos de mapeamento em *Brachiaria*, já que esta região se mostra conservada entre gramíneas (Gualtieri *et al.*, 2006; Conner *et al.*, 2008) e que o genoma de *Brachiaria* ainda foi seqüenciado.

OBJETIVOS

GERAL

Contribuir para o conhecimento genético da gramínea forrageira tropical *Brachiaria humidicola*, analisando sua diversidade genética e estudando a estrutura do genoma da espécie por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite

ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Brachiaria humidicola*, a partir de uma biblioteca enriquecida com microssatélites, isolando-os, desenhando *primers* e determinando as condições de amplificação dos locos;
- Avaliar a diversidade genética intra-específica disponível nos acessos do banco de germoplasma da espécie;
- Construir um mapa genético-molecular para a espécie a partir de uma progênie de irmãos completos derivada do cruzamento entre um genótipo sexual e uma cultivar apomítica;
- Mapeamento da apomixia do tipo aposporia nesta mesma população.

CAPÍTULO I

Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola*

(Rendle) Schweick

L. Jungmann • B. B. Z. Vigna • J. Paiva • A. C. B. Sousa • C. B. do Valle • P. R. Laborda •
M. I. Zucchi • A. P. de Souza

*O trabalho foi publicado pela revista Conservation Genetics Resources (2009) 1: 475–
479 - DOI: 10.1007/s12686-009-9111-y

Received: 17 September 2009 / Accepted: 17 September 2009 / Published online: 9
October 2009

L. Jungmann • C. B. do Valle

Plant Biotechnology Laboratory, EMBRAPA Beef
Cattle,
CP 154, Campo Grande, MS CEP 79002-970,
Brazil

M. I. Zucchi

Agronomic Institute of Campinas (IAC), CP 28,
Campinas, SP CEP 13.012-970, Brazil

B. B. Z. Vigna • J. Paiva • A. C. B. Sousa • P. R.
Laborda • A. P. de Souza

Center for Molecular Biology and Genetic
Engineering,

University of Campinas (UNICAMP), CP 6010,

Campinas, SP CEP 13.083-970, Brazil

A. P. de Souza

Biology Institute, Plant Biology Department,
University of Campinas (UNICAMP), CP 6109,
Campinas, SP CEP 13083-970, Brazil

e-mail: anete@unicamp.br

Abstract

We describe the first panel of nuclear simple sequence repeats (SSRs) loci for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick., a warmseason grass with facultative apomixis, variation in ploidy levels (6X–9X), and important forage grass species in the Tropics. Of 38 pairs of primers obtained by using an enriched-library methodology, 27 revealed polymorphism in 58 accessions of the Germplasm Collection of *B. humidicola* held at Embrapa Beef Cattle, Brazil. Eleven loci amplified in *B. dictyoneura*, a closely related species with unclear taxonomic boundaries with *B. humidicola*. Transferability to other three *Brachiaria* species was also evaluated. The developed microsatellites are potentially useful for genetic studies of *B. humidicola*, as well as phylogenetic evaluations, conservation and breeding applications.

Keywords *Urochloa humidicola* • Koroviniagrass • SSRs • Taxonomy • Genetic diversity

Brachiaria (Trin.) Griseb. is a large genus of grasses that belongs to the tribe Paniceae, in the subfamily Panicoideae of the family Poaceae. It contains about 100 species distributed throughout the Tropics. Many aspects of taxonomic relationships among *Brachiaria* species and the related genera *Urochloa*, *Eriochloa* and *Panicum* remain unclear. Such taxonomic issues have been largely discussed since *Brachiaria* was elevated to the category of genus by Grisebach (1853). *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. is an African perennial stoloniferous species that aposporous pseudogamous apomixis is the predominant reproduction mode. Although apomixis is facultative, in most genotypes it prevails over sexuality. Sexual biotypes analyzed to date are hexaploids, while apomixis present ploidy varying from hexa to nonaploids. According to the W3TROPICOS, the nomenclatural database of the Missouri Botanical Garden, this species has been classified as *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp, by Veldkamp (1996), *Brachiaria dictyoneura* subspecies *humidicola* (Rendle) Catasús, by Catasús Guerra (2001) and *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, by Zuloaga and Morrone (2003). In fact, *B. humidicola* (Rendle) Schweick. is closely related to *B. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stap. and, at times, the identification of these two species is not unequivocal. The disputable taxonomic allocation of *B. humidicola* is, in part, a consequence of taxonomic studies based only on morphological descriptors. Based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS), Gonzalez and Morton (2005) reviewed taxonomic relationships among *Brachiaria*, *Eriochloa*, *Urochloa*, including *U. humidicola* within the classification of Morrone and Zuloaga (1992), and six other Paniceae species. Further investigations using markers spread across the genome have not been reported.

The present work describes the first panel of microsatellites (SSRs) isolated from *B. humidicola*, some of which can be transferred to other *Brachiaria* species. The objective was to develop SSR markers potentially useful for elucidating phylogenetic

Table 1 Description of SSR markers developed for *Brachiaria humidicola*

SSR locus	GenBank accession number	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size (bp)	Primer sequences (5' - 3')	Characteristics in <i>B. humidicola</i>			Transferability ^{1,2}			
						No. of bands	Size range (bp)	PIC	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. dictyoneura</i>	<i>B. ruziziensis</i>
BhUNICAMP001	GQ981353	(GA) ₅	60	248	CATAGAAGCTCCTCAATGTGTTT GATGGATATGGATGGGTGTAAT	9	248-268	0.79	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP002	GQ981354	(GT) ₃ ...(CTT) ₃ ...(GT) ₇ ...(CT)	60	251	AGCCATACCTCCTTGTTGT AGCTCTTGATACCACTTGTTAG	8	236-264	0.72	1/3	3/3	7/8	0/3
BhUNICAMP003	GQ981355	(AC) ₆ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃	60	193	CTGTCAGCATGGTTCACATAATA GCATCGAATAAAGCTCAGAAAAG	17	174-204	0.79	3/3	3/3	8/8	0/3
BhUNICAMP004	GQ981356	(GT) ₁₀ ...(GT) ₃	60	231	AGTTTGCTGCCTCTTTGATTC GTGGCGCTACCTTCTTGTTG	10	230-260	0.81	1/3	2/3	5/8	0/3
BhUNICAMP005	GQ981357	(CA) ₈ T(AC) ₃	62	205	CACTGCATCAACTACCCACCAC GTCTGCTTTGCTTGGCTTACCT	12	180-218	0.86	3/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP006	GQ981358	(TTTG) ₄	48	226	ATGAAGAACGGCGATAAAT AGCTGACCCCGATAACTG	7	196-218	0.64	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP007	GQ981359	(TG) ₁₆ ...(GCA) ₄	57	201	CTAGGCAACAAAGCACTCAAAA GCACCACAACCTCCATAGCAGAT	10	179-212	0.61	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP008	GQ981360	(GA) ₁₈	60	264	AACAGAATAACTGCGAGAAGG ACTGAGCCGGTTGAAAATA	9	248-278	0.56	1/3	0/3	6/8	0/3
BhUNICAMP009	GQ981361	(AG) ₆	57	211	GGCTCTCGCTGGTCTGAAT TGTGCTAGGCTCGGGAATAC	9	210-250	0.78	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP010	GQ981362	(TG) ₆	55	198	GGTTTCGTGCTGTTTCTT CAGTTGACCTACACCGCTACAC	13	172-202	0.81	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP011	GQ981363	(TA) ₅	57	193	ACGTTAACTTTCCCGCTTCT TGCTAAATATGATCGCCAAC	4	192-198	0.55	0/3	0/3	1/8	0/3
BhUNICAMP012	GQ981364	(GT) ₉ G(GA) ₅	60	166	TGGGTGAGCCGAAAACCTC TCGCCTTACTACGCTGTCTCA	11	160-182	0.74	2/3	2/3	2/8	2/3
BhUNICAMP013	GQ981365	(TCA) ₆	60	205	TTTCTCGCCCTTTGCTTCT TTCATACCTCCACTGCCTCTAA	5	187-208	0.70	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP014	GQ981366	(AC) ₆ AT(AC) ₄	57	262	GGAGTATGTGCTATGATTATGT CAAAGGTCCTATTCTGTA	9	250-264	0.77	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP015	GQ981367	(GT) ₈	60	269	AGGGGAGAACTGTGGTGGTGC TCGAGTTTTGAGGGTGGGATTG	8	248-272	0.73	0/3	0/3	2/8	3/3
BhUNICAMP016	GQ981368	(CT) ₆ (AT) ₆ (GT) ₉	60	266	CATGCGTAGCCCCACTGT GCTTTCCTTCATGTTCCCTATCC	21	260-320	0.95	3/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP017	GQ981369	(GT) ₃ GA(GT) ₃	60	219	ACTGCTTCTCGATGCTGTG GTGTTTACGATGCCCTGAG	2	218-222	0.06	1/3	3/3	8/8	0/3
BhUNICAMP018	GQ981370	(AC) ₃ TC(AC) ₄	62	197	TCCATATCCAACAAGGCAACAT GCGCGAGCTGGTGAAGT	9	190-210	0.82	3/3	3/3	8/8	0/3

Table 1 continued

SSR locus	GenBank accession number	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size (bp)	Primer sequences (5' - 3')	Characteristics in <i>B. humidicola</i>			Transferability ^{1,2}			
						No. of bands	Size range (bp)	PIC	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. dictyoneura</i>	<i>B. ruziensis</i>
BhUNICAMP019	GQ981371	(AAAAC) ₃ ...(CT) ₁₇	60	262	ATGAGAGGGAAGGAAGGGTAGA CTTAAAGTGGGTCAGTGTGTC	29	250-340	0.94	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP020	GQ981372	(GCCG) ₃ ...(AC) ₉	60	231	CGGCCGGTTCACCTCGT GGCACTCGGACTCCCATAACTC	14	220-256	0.81	3/3	3/3	8/8	3/3
BhUNICAMP021	GQ981373	(AG) ₁₈	60	311	TCACATGCTGCGAAGAAT GCCATGTCCTCAGTTGTTT	17	268-330	0.86	2/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP022	GQ981374	(AG) ₁₇	60	223	TTAAGCAATGAGGAAGTGTGGA ATGTTTTCACTGGAGGGTTCT	15	190-242	0.83	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP023	GQ981375	(CA) ₇	60	288	AGGCGTTGTATCTCCGTCGTCT GGCTCACTCACTTCCCCTG	10	230-310	0.77	NE	NE	NE	NE
BhUNICAMP024	GQ981376	(CA) ₇	60	194	TCAATGTCGCTCAGAAT GACACTCTTTCGTTCAATG	9	186-206	0.66	NE	NE	NE	NE
BhUNICAMP025	GQ981377	(TC) ₃ (TG) ₅ (AG) ₅	60	184	GAGAGTGGGGTGTATCAT GACAGAGGGCGTATCACAT	18	168-246	0.90	2/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP026	GQ981378	(GT) ₇	60	233	CCTCCACGGTTACTTCAAA AAATATCCGAGCTCCAACATC	16	214-238	0.85	0/3	0/3	3/8	0/3
BhUNICAMP027	GQ981379	(CT) ₁₆	60	199	CATTGGTCTGGCTTTGATTG TGCACTTCCCTTGATGACTTAC	22	166-214	0.94	1/3	2/3	8/8	2/3

NE: not evaluated

¹ Number of successfully amplified genotypes /Number of tested genotypes² Nomenclatural classification: *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.)
Brachiaria decumbens Stap.
Brachiaria dictyoneura (Fig. & De Not.)
Brachiaria ruziensis Germain & Evraud

aspects within this taxon, and also for conservation and breeding purposes. Genomic DNA samples were extracted from freeze-dried leaf samples using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle 1987). A genomic library was constructed using one *B. humidicola* genotype, following the methodology of Billotte et al. (1999) and according to Jungmann et al. (2009). A total of 384 clones were sequenced in an ABI 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Thirty-eight pairs of primers were designed with the Primer Select 5.01 software (DNASTAR Inc.) and assayed in 58 genotypes of *B. humidicola* from the germplasm collection of Embrapa Beef Cattle. Polymerase chain reactions (PCR) were carried out on a MJ Research PTC-100TM thermocycler in 25 μ l final volume of reaction mixture consisting of buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl), 50 ng of genomic DNA, 0.8 μ M of each primer, 150 μ M dNTPs and 1 U Taq DNA polymerase. After an initial denaturation step at 94°C for 1 min, PCR amplifications were performed in 30 cycles of 94°C for 1 min, X°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 7 min, being X°C the annealing temperature (Ta) for each locus (Table 1). Amplification products were resolved by electrophoresis in 3% agarose and 6% denaturing polyacrylamide gels, silver stained according to Creste et al. (2001). Of the 38 SSRs primer pairs tested, 36 amplified successfully in *B. humidicola* and 27 SSRs were polymorphic (Table 1). Polymorphism Information Content (PIC) values for each locus was obtained according to Cordeiro et al. (2003) for 58 accessions of *B. humidicola*. Mean PIC of all loci was 0.75. The highest PIC values were 0.95, 0.94 and 0.94 for the loci BhUNICAMP016, BhUNICAMP019 and BhUNICAMP027, respectively. Therefore, these three loci are the most informative in this panel of SSRs. The locus BhUNICAMP017 resulted in a low PIC value (0.06), as expected because of its low polymorphism observed. This locus showed only two bands and one of these bands was present exclusively in one genotype, while the other was present in all genotypes (data not

shown). Transferability of the developed SSR primer pairs was tested in *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* for 25 microsatellite primer pairs, under the same PCR conditions used for *B. humidicola*. Number of successfully amplified genotypes per number of genotypes tested per species is indicated in Table 1. The primers used to amplify the SSR loci BhUNICAMP006, BhUNICAMP007 and BhUNICAMP009 did not amplify in any of the tested genotypes. In general, the highest success of transferability was obtained in *B. dictyoneura*, in which 22 SSR primer pairs were cross-amplified in at least one genotype. Of these 22 SSR primer pairs, 13 cross-amplified in more than 75% of the individuals evaluated from other *Brachiaria* species. These results were expected since the *B. dictyoneura* species is more closely related to *B. humidicola* than to the other three species (Renvoize et al. 1996; Gonzalez and Morton 2005). *B. ruziziensis* was a scoreless species in which only seven SSR primer pairs could be cross-amplified.

The data reported herein indicated that the SSR markers developed for *B. humidicola* represent a set of powerful genetic resources that are potentially useful for further studies of genetic diversity and mapping in *B. humidicola* and in other *Brachiaria* species.

Acknowledgements

The authors would like to thank Felipe Rodrigues da Silva for assisting with bioinformatics. This work was supported by grants from Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Foundation for Science and Technological Development of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT). The authors are also grateful to FUNDECT for graduate fellowship to Jungmann, L., FAPESP

for undergraduate fellowships to Paiva, J. and Vigna, B.B.Z. and graduate fellowships to Sousa, A. C. B. and Laborda, P. R. and, to CNPq for a research fellowship awarded to Souza, A. P.

References

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288

Catasús Guerra L (2001) De Poaceis Cubensibus Notulae, III (In: *Floram Novam Cubensem Stvdia Intendentia*). *Fontqueria* 55(4):15–17

Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Sci* 165(1):181–189

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19:299–306

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15

Gonzalez AMT, Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol Phylogenet Evol* 37(1):36–44

Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed) *Flora Rossica*, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp 324–484

Jungmann L, Sousa ACB, Paiva J, Francisco PM, Vigna BBZ, Valle CB do, Zucchi MI, Souza AP (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap Conserv Genet. doi:10.1007/s10592-009-9839-7

Morrone O, Zuloaga FO (1992) Revisión de las Especies Sudamericanas Nativas e Introducidas de los Géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). Darwiniana 31:43–109

Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, Valle do CB (eds) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 1–15

Veldkamp JF (1996) *Brachiaria, Urochloa* (Gramineae—Paniceae) in Malesia. Blumea 41(2):413–437

Zuloaga FO, Morrone O (2003) *Urochloa*. In: Catalogue of New World grasses (Paleae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae, vol 46. Contributions from the United States National Herbarium, Washington, pp 629–634

CAPÍTULO II

Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin

L. Jungmann, B.B.Z. Vigna, K.R. Boldrini, A.C.B. Sousa, C.B. do Valle, R.M.S. Resende,
M.S. Pagliarini, M.I. Zucchi, and A.P. de Souza

*O trabalho foi publicado pela revista Genome (2010) 53: 698–709 - DOI: 10.1139/G10-055

Received 28 January 2010. Accepted 14 June 2010. Published on the NRC Research Press Web site at genome.nrc.ca on 24 August 2010.

L. Jungmann.¹ Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Center for Beef Cattle Research, Plant Biotechnology Laboratory, CP 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brazil; University of Campinas (Unicamp), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

B.B.Z. Vigna¹ and A.C.B. Sousa. University of Campinas (Unicamp), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

K.R. Boldrini and M.S. Pagliarini. University of Maringá (UEM), Biological Sciences Center, Genetics and Cell Biology Department, Av. Colombo, 5790, Zona 7, Maringá, PR 87020-900, Brazil.

C.B. do Valle and R.M.S. Resende. Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Center for Beef Cattle Research, Plant Biotechnology Laboratory, CP 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brazil.

M.I. Zucchi. APTA Pólo Centro Sul, Rod. SP 127 km 30, CP 28, Piracicaba, SP 13400-970, Brazil.

A.P. de Souza.² University of Campinas (Unicamp), Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), CP 6010, Campinas, SP 13083-970, Brazil; University of Campinas (Unicamp), Biology Institute, Plant Biology Department, CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil.

¹These authors contributed equally to this work.

²Corresponding author (e-mail: anete@unicamp.br).

Abstract

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick. is a warm-season grass commonly used as forage in the tropics. Accessions of this species were collected in eastern Africa and massively introduced into South America in the 1980s. Several of these accessions form a germplasm collection at the Brazilian Agricultural Research Corporation. However, apomixis, ploidy, and limited knowledge of the genetic basis of this germplasm collection have constrained breeding activities. The objectives of this work were to identify genetic variability in the Brazilian *B. humidicola* germplasm collection using microsatellite markers and to compare the results with information on the following: (1) collection sites of the accessions; (2) reproductive mode and ploidy levels; and (3) genetic diversity revealed by morphological traits. The evaluated germplasm population is highly structured into four major groups. The sole sexual accession did not group with any of the clusters. Genetic dissimilarities did not correlate with either geographic distances or genetic distances inferred from morphological descriptors. Additionally, the genetic structure identified in this collection did not correspond to differences in ploidy level. Alleles exclusive to either sexual or apomictic accessions were identified, suggesting that further evaluation of the association of these loci with apospory should be carried out.

Keywords: koroniviagrass, *Urochloa humidicola*, forage grass, variability, molecular markers, aposporous apomixis.

Introduction

Koroniviagrass is one of the vernacular names adopted in the New World for a grass species that is characterized as a perennial stoloniferous plant possessing narrow, wiry stems and narrow, glabrous leaves (Miles et al. 2004). The center of origin and dispersion of koroniviagrass is eastern Africa. Over the last several decades, koroniviagrass has been thought to belong to the brachiariagrass group, which is formed by many species included in the genus *Brachiaria*, as defined by Grisebach (1853). Grisebach incorporated several species into this genus that were previously classified in the section *Panicum* by Trinius (1834). Thus, the taxonomy of these grasses has been very controversial, as it is for the genus *Brachiaria* (syn. *Urochloa*) itself (reviewed in Torres González and Morton 2005). *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. is a species included in this disputable taxonomy. In the present work, *B. humidicola* was chosen as a reference to koroniviagrass because of its recognition as a species for over 100 years and its relation to economically important forage crops in the tropical Americas.

Brachiaria humidicola naturally occurs in areas of infertile and poorly drained soils or areas with seasonal flooding. For this reason, it has been largely exploited in the tropics as a forage option over other brachiariagrasses, mostly in the dry African savannas and similar environments such as the Brazilian Cerrados. The wide use of *B. humidicola* as a pasture grass was made possible by its massive introduction into South America following a plant collection expedition supported by Bioversity International (formerly International Plant Genetic Resources Institute) and carried out by the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) in collaboration with the International Livestock Center for Africa.

Fifty-eight accessions, out of the 67 held in CIAT (CIAT 2009), were imported to Brazil by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). Agronomic and morphological evaluations, as well as studies concerning reproductive mode and cytogenetics, were then performed in the Tropical Forages Breeding Program at the Center for Beef Cattle Research of this institution (Embrapa Beef Cattle [EBC]).

The genetic characterization of elite germplasm is a central requirement of successful breeding programs. DNA polymorphism analysis allows access to genetic variability (Nybom 1994; Zhang et al. 1999) because it is not subject to environmental effects and it establishes the genetic relationships among the accessions of the collection, providing information on population structure and allelic richness in the germplasm (Sakiroglu et al. 2010). This information helps breeders to use genetic resources for cultivar development more effectively, including recommending parents for breeding crosses (Ferreira 2003).

Seeking to generate specific molecular markers suitable for confident genetic analysis, our group described the first set of microsatellite markers for *B. humidicola* (Jungmann et al. 2009). The combination of morphological, agronomic, and genetic distance data increases the chances of achieving new superior genetic combinations or even amplifying the population variability in crosses between related morphological types that are genetically distant (Ferreira 2003). Several groups have reported the use of morphological, agronomic, and molecular data to characterize germplasm, as shown by Hartings et al. (2008) in maize, Gavrilenko et al. (2010) in potato, and Liu et al. (2007) in wheat. In the present work, we report the genetic characterization of the 58 accessions of koroniviagrass held at EBC and two commercial cultivars by using previously reported microsatellite loci (Jungmann et al. 2009). Geographical origin of accessions and ploidy were considered in the germplasm analysis. The correlation between genetic diversity assessed by microsatellites and morphological descriptors is also discussed.

Materials and methods

Plant materials

Fifty-eight accessions from the *B. humidicola* germplasm collection maintained at EBC and two commercial cultivars were analyzed using microsatellite markers. Of the 58 accessions, 34 had morphological descriptors previously evaluated by C.B. do Valle

(unpublished data). Table 1 summarizes the 58 accessions, as recorded in the EBC and CIAT collections, and the cultivars Tupi and Common Humidicola (hereafter referred to as COM). The mode of reproduction, total number of chromosomes, estimated ploidy, country where the material was collected, and geographic coordinates of the collection sites are described when available. Data concerning the number of chromosomes and predicted ploidy levels were obtained from Boldrini (2009).

Genotyping using microsatellite markers

Genomic DNA samples were extracted from freeze-dried leaves of all genotypes using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle 1987). PCR was performed using the conditions previously described by Jungmann et al. (2009). Allelic dosage could not be estimated because of the polyploid nature of the plants (Table 1), and microsatellites were scored based on presence or absence of bands. The 60 genotypes were evaluated for the presence of 27 microsatellite loci previously described by Jungmann et al. (2009): BhUNICAMP001–027.

Population structure and genetic diversity assessment with microsatellite data

Microsatellite scores for the 60 individuals were evaluated with a model-based method using the Bayesian clustering approach in STRUCTURE software version 2.2 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007). Admixture (AD) and no-admixture (NA) models were tested with 500 000 replicates for burn-in and 500 000 replicates for Markov Chain Monte Carlo processes through five iterations (runs). Numbers of clusters (K) were tested from 1 to 10. For each model, analyses were conducted with both correlated (AFC) and independent allele frequencies (AFI) for the putative populations. To determine the most appropriate K, standard deviations of the likelihood values for each K (KSD) along the five runs were

Table 1 List of all *B. humidicola* accessions used in this study along with the identification of accessions (ID), annotated numbers, reproductive mode, chromosome number, ploidy, country of origin, latitude and longitude, morphological trait analysis and maximum number of alleles scored at one locus

^a ID		^f GEO (decimal degrees)								
EBC	CIAT	^b AN	^c REP	^d CN	^e PL	COUNTRY	^g LAT	^h LON	ⁱ MOR	^j MNAS
H001	16175	1	APO	2n = 36	6X	Ethiopia	9.750	35.150	N	6
H002	16178	2	APO	2n = 36	6X	Ethiopia	6.900	38.450	N	4
H003	16180	3	APO	2n = 42	7X	Ethiopia	5.867	39.133	N	6
H004	16181	4	APO	2n = 42	7X	Ethiopia	5.817	39.267	N	6
H005	16182	5	APO	2n = 36	6X	Ethiopia	6.683	37.783	Y	5
H006	16867	6	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.017	30.550	Y	6
H007	16870	7	APO	2n = 36	6X	Zimbabwe	-17.350	31.533	Y	5
H008	16871	8	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-17.167	31.067	Y	6
H009	16879	9	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.433	32.133	Y	6
H010	16880	10	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.283	32.717	N	5
H011	16881	11	ND	ND	ND	Zimbabwe	-18.117	31.833	N	6
H012	16882	12	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.150	31.817	N	5
H013	16886	13	APO	2n = 36	6X	Zimbabwe	-20.233	31.400	Y	5
H014	16889	14	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-19.983	30.767	Y	7
H015	26141	15	APO	2n = 36	6X	Burundi	-4.233	29.783	N	6
H016	26149	16	APO	2n = 36	6X	Burundi	-4.233	29.783	N	7
H017	26154	17	APO	2n = 36	6X	Burundi	-3.150	30.150	N	6
H018	26155	18	APO	2n = 36	6X	Burundi	-3.517	29.967	Y	6
H019	16350	19	APO	2n = 36	6X	Ethiopia	11.367	37.033	N	6
H021	16868	20	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-17.883	30.717	Y	6
H022	16874	21	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-16.533	29.567	Y	6
H023	16877	22	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-16.700	29.767	N	6
H024	16878	23	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.183	31.967	Y	5
H025	16883	24	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.683	32.633	N	5
H026	16887	25	APO	2n = 36	6X	Zimbabwe	-20.083	31.150	Y	9
H027	16888	26	APO	2n = 36	6X	Zimbabwe	-20.283	31.533	Y	7
H028	16890	27	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-19.450	30.633	Y	8
H029	16892	28	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.783	27.000	Y	7
H030	16894	29	APO	2n = 42	7X	Zimbabwe	-18.867	27.183	N	8
H031	26146	30	SEX	2n = 36	6X	Burundi	-3.983	30.033	Y	8
H033	26407	31	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-7.767	35.883	Y	7
H034	26411	32	APO	2n = 36	6X	Tanzania	-8.100	35.433	Y	4
H035	26413	33	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-8.417	35.333	Y	7
H036	26414	34	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-8.583	35.150	Y	7
H037	26415	35	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-8.517	35.067	Y	6
H038	26416	36	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-9.100	34.817	N	8

Table 1 Continued

^a ID						^f GEO (decimal degrees)				
EBC	CIAT	^b AN	^c REP	^d CN	^e PL	COUNTRY	^g LAT	^h LON	ⁱ MOR	^j MNAS
H039	26427	37	APO	2n = 36	6X	Tanzania	-9.400	33.817	Y	5
H040	26430	38	APO	2n = 36	6X	Tanzania	-9.450	33.850	Y	5
H041	26432	39	APO	2n = 36	6X	Tanzania	-8.783	33.567	Y	5
H042	16866	40	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-17.667	31.283	Y	6
H043	16869	41	APO	2n = 36	6X	NA	NA	NA	N	5
H044	16884	42	APO	2n = 54	9X	Zimbabwe	-18.833	32.533	Y	6
H045	16885	43	APO	2n = 36	6X	Zimbabwe	-20.150	32.617	Y	5
H046	26145	44	APO	2n = 36	6X	Burundi	-3.200	30.550	N	4
H047	26159	45	APO	2n = 36	6X	NA	NA	NA	Y	6
H048	NA	46	APO	2n = 42	7X	NA	NA	NA	N	5
H101	26574	47	APO	2n = 54	9X	South Africa	NA	NA	N	7
H105	NA	48	APO	2n = 54	9X	NA	NA	NA	Y	8
H106	6013	49	APO	2n = 54	9X	South Africa	NA	NA	Y	6
H107	NA	50	APO	2n = 54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H108	NA	51	APO	2n = 54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H112	6705	52	APO	2n = 54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H118	16774	53	ND	ND	ND	NA	NA	NA	N	5
H119	26130	54	APO	ND	ND	NA	NA	NA	N	8
H121	26371	55	APO	2n = 54	9X	Tanzania	-8.350	35.300	N	8
H124	26438	56	APO	2n = 54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H125	6133	57	APO	ND	ND	Zambia	-10.150	31.833	N	5
H126	6369	58	APO	2n = 42	ND	NA	NA	NA	N	5
COM	NP	59	APO	ND	ND	NP	NP	NP	N	5
Tupi	NP	60	APO	ND	ND	NP	NP	NP	N	6

^aID: Identification of accessions and cultivars from Embrapa Beef Cattle (EBC) and the International Center for Tropical Agriculture (CIAT)

^bAN: annotated number for analysis in STRUCTURE (Figure 3)

^cREP: reproductive mode

^dCN: chromosome numbers

^ePL: ploidy

^fGEO: geographic coordinates

^gLAT: latitude

^hLON: longitude

ⁱMOR: accessions analyzed by Assis (2001) and Assis et al. (2003) with 24 morphological traits (Y: yes; N: no)

^jMNAS: maximum number of alleles scored at one locus for all loci.

Note: NA: not available; ND: not determined. NP: not pertinent

compared with DK values estimated according to Evanno et al. (2005). An analysis of molecular variance (AMOVA) was used to verify the diversity among clusters suggested by our STRUCTURE analysis with 1 000 permutations using ARLEQUIN software version 3.1 (Excoffier et al. 2005). Additionally, molecular data were analyzed with similarity-based methods. Pairwise dissimilarity matrices were obtained from Jaccard's coefficient (Jaccard 1908). Graphical representations of the similarity-based matrix were generated by applying the unrooted neighbor joining (NJ) method, the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA), and principal coordinate analysis (PCA) using DARwin software version 5.0.157 (Perrier et al. 2003; Perrier and Jacquemoud-Collet 2006). The bootstrap method was employed to evaluate the reliability of tree topology with 10 000 replicates using BOO software version 3.0 (Coelho 2000). The resulting groups were visually compared with clusters generated by STRUCTURE analysis. To clearly state to the reader when we are referring to one approach or the other, the terms clustering and cluster(s) are used when referring to the results obtained from the Bayesian analysis, and the terms grouping and group(s) are used when referring to results obtained with methods based on similarity.

Geographic distribution

Available geographic coordinates of the accession collection sites were retrieved from the forages database (CIAT 2009). Geographic Distance Matrix Generator software (Ersts 2009) was used to construct a matrix of linear distances (metres) between pairs of genotypes. The correlation between this matrix and the similarity-based matrix obtained for the microsatellites was tested using DARwin software version 5.0.157. The geographic plots of the accessions' origins (see Fig. 6) were visualized with DIVA-GIS 5.2.0.2 (Hijmans et al. 2001).

Analysis of genetic distances revealed using morphological descriptors

Twenty-four morphological traits were evaluated in *B. humidicola* accessions (five replications per accession) by Assis (2001) and Assis et al. (2003). The following traits were analyzed: (1) 6 vegetative traits consisting of plant height, plant growth habit, leaf length, leaf width, leaf growth habit, and length of leaf sheath; (2) 10 reproductive traits comprising length of floral stem, inflorescence length, number of racemes, length of basal raceme, number of spikelets on basal raceme, spikelet insertion, rachis width, spikelet spot percentage, stigma color, and anther color; and (3) 8 pubescence traits consisting of density of rachis pubescence, length of rachis pubescence, density of leaf blade pubescence, length of leaf blade pubescence, margin of the leaf blade, density of leaf sheath pubescence, length of leaf sheath pubescence, and distribution of leaf sheath pubescence. In the present work, the mean values of these traits (per accession) were standardized by dividing each value by the trait standard deviation. Subsequently, pairwise matrices of Euclidean distances were calculated using NTSYSpc software version 2.10m (Rohlf 2000). A Jaccard's similarity matrix was constructed using microsatellite data from the morphologically evaluated accessions to estimate the correlation between genetic distances estimated with morphological traits and molecular dissimilarities. Correlations were estimated with the Mantel test (Mantel 1967) using NTSYSpc software version 2.10m.

Results

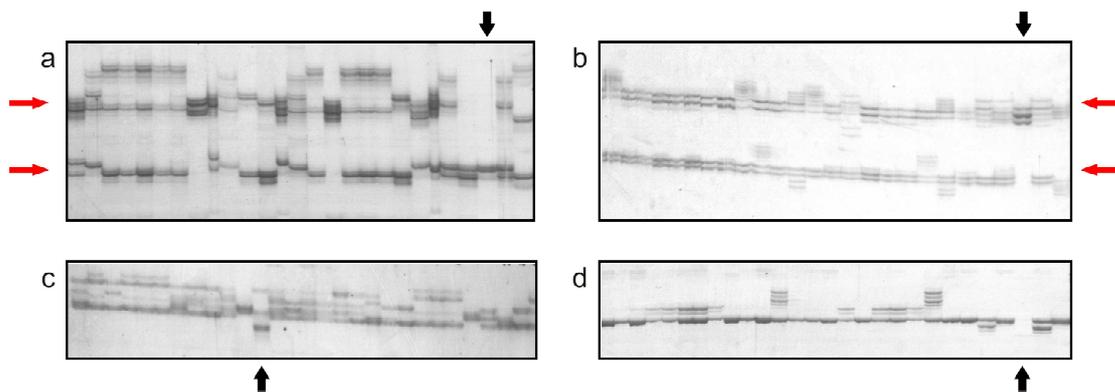
Microsatellite analysis

In this study, 58 accessions and 2 cultivars of *B. humidicola* were genotyped with 27 microsatellite loci. Allelic profiles resulting from the combination of all loci revealed 60 distinct genotypes, thus indicating that this germplasm collection does not contain duplicated materials. Accession numbers, the respective mode of reproduction, chromosome counts, ploidy levels, and geographic coordinates of collection sites are shown in Table 1. Data on the polymorphism information content (PIC) of the loci, the number of alleles scored as bands, allele size ranges, and transferability of microsatellites to other *Brachiaria* species (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, and *B. ruziziensis*) were previously published (Jungmann et al. 2009).

The maximum numbers of alleles scored simultaneously at a single locus (MNAS) were four (3 accessions), five (16 accessions and COM), six (19 accessions and Tupi), seven (12 accessions), eight (7 accessions), and nine (1 accession), as shown in Table 1. Forty-nine individuals (of the 54 that underwent chromosome counting) presented MNAS in agreement with expectations according to their predicted ploidy levels; for example, we observed a maximum of six alleles per locus in individuals behaving as hexaploids in cytogenetic analyses (forming hexavalents at the metaphase plate). However, five individuals presented MNAS higher than expected based on ploidy levels (Table 1), which is likely due to gene duplication (Zhang and Rosenberg 2007).

The amplification pattern of accession H031 (sexual) was often distinct from that of the apomictic accessions at eight loci (an example is given in Fig. 1). We were able to identify five alleles exclusive to H031. In contrast, of all 326 alleles scored across the 27 loci we investigated, 276 were absent in H031. Five loci (BhUNICAMP001, BhUNICAMP008, BhUNICAMP016, BhUNICAMP021, and BhUNICAMP028) failed to amplify in H031 in three PCR repetitions, even using genomic DNA samples obtained from two different extractions, suggesting a mutation in the primer site.

Fig. 1. Allele profiling of *B. humidicola* accessions with the loci BhUNICAMP005 (a), BhUNICAMP003 (b), BhUNICAMP018 (c), and BhUNICAMP008 (d). Amplification of two diverse genome regions (a and b) is indicated by horizontal arrows. Although not all individuals are represented in the images, this pattern was observed in all genotypes except for H029 and H031 at the microsatellite locus BhUNICAMP005 and H031 at the locus BhUNICAMP003. The distinct allele profiling of H031 is indicated by vertical arrows (a–d). Locus BhUNICAMP008 is an example of a locus that did not amplify in H031.



Population structure inferred from microsatellites

As a preliminary step for determining population structure, a model-based method was applied. The Bayesian approach implemented using STRUCTURE software allocated individuals into clusters by estimating the likely membership coefficients (Q) of these individuals for each cluster. In this analysis, a model was assumed in which there are K populations (where K may be unknown), each of which is characterized by a set of allele frequencies at each locus. According to Pritchard et al. (2000), individuals in the sample are assigned (probabilistically) into populations or clusters, or they are assigned jointly to two or more populations if their genotypes indicate that they are admixed. Owing to the nature of the studied material, which belongs to a germplasm collection, we preferred not to assume that clusters of individuals represent natural populations. Because of this, we use the term “cluster” in this manuscript to refer to one (or a combination of more than one) individual characterized by a distinguishable allelic set.

For each of the four analyses conducted (NA/AFC, NA/AFI, AD/AFC, and AD/AFI), the KSD and DK resulted in a different number of clusters being most likely, but $K = 8$ presented a high likelihood value (if not the highest) in all of the surveys. Nevertheless, the membership coefficients (Q) for assigning individuals into clusters were very similar for each K value over the four analyses conducted, resulting in analogous clustering and assignment patterns for a given K . We verified that the clustering patterns were the same for a given K value regardless of whether an admixture or noadmixture model was assumed and whether allele frequencies were correlated or not. Given the points raised by Pritchard et al. (2000) concerning the problem of inferring the appropriate value of K , and because we attempted to identify a K value resulting in biologically reasonable results (in which the sexual accession, H031, could be distinguished from the others), we found the NA/AFC method with $K = 8$ was the best choice in this work.

For $K = 8$, it was possible to identify eight allelic pools, distinguishable in Fig. 2 by eight different colors (red, green, yellow, orange, dark blue, pink, light blue, and purple). However, in Fig. 2 one can distinguish only four clusters containing two or more individuals — I (31 members), II (14 members), III (8 members), and IV (6 members) — and a fifth cluster (V) formed by a single individual (the sole sexual accession in the sample). Estimated membership coefficients (Q) of each individual for each allelic pool are shown in Table S1.3 Figure 3 is another graphical representation of STRUCTURE results with individuals ordered sequentially (1 to 60, according to Table 1).

The AMOVA showed highly significant ($P < 0.001$) differentiation among groups I, II, III, IV, and V, indicating that approximately 44% of the variation can be explained by germplasm subdivision into these five clusters (Table 2).

Similarity-based methods (PCA, NJ, and UPGMA) resulted in groups similar to the clusters generated by STRUCTURE, as indicated by the colors in the biaxial plot obtained

Fig. 2. Analysis performed in STRUCTURE 2.2 using a no-admixture model with correlated allele frequencies. The clustering profile obtained for $K = 8$ is displayed, as indicated by different colors. Each of the 60 individuals is represented by a single column broken into colored segments with lengths proportional to each of the K inferred gene pools. Four major clusters of individuals were identified and are indicated by numbers I, II, III, and IV. The sexual accession, H031, is indicated as cluster V.

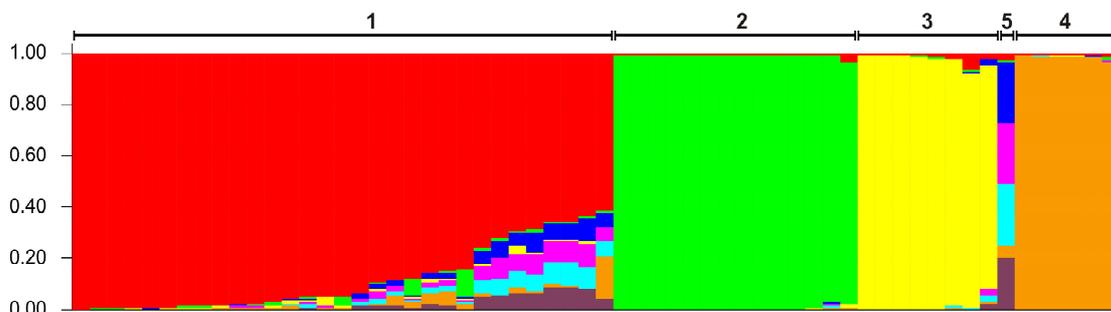


Fig. 3. Additional view of the results generated by STRUCTURE 2.2. Accessions (1 to 58) and two cultivars (59 and 60) are identified by sequential numbers below the plot, which correspond to AN (annotation numbers) in Table 1. Membership coefficients (y-axis) are indicated, which were used to allocate individuals into clusters (same as Fig. 2). Column 30 represents H031, the sole sexual accession.

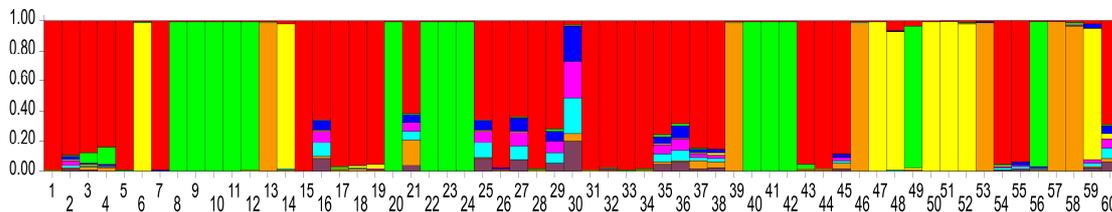


Table 2. Analysis of molecular variance of the four major groups of individuals and the sexual accession (H031).

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P
Among clusters	4	589.416	13.37808	44.32	0.00000±0.00000
Within clusters	55	924.334	16.80608	55.68	
Total	59	1513.750	30.18416		

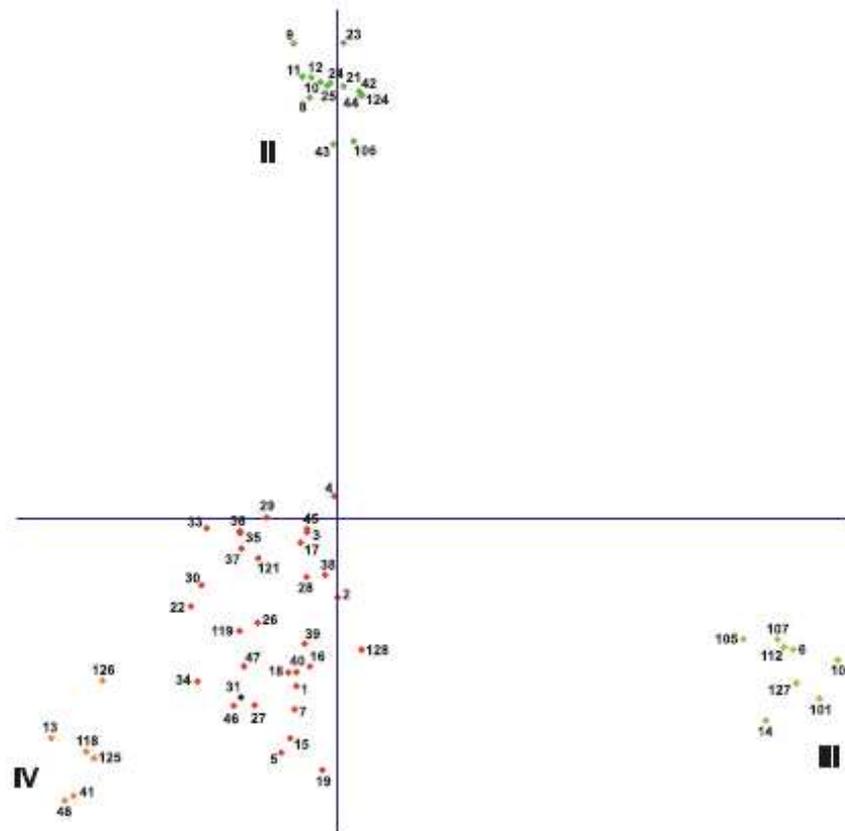
with PCA (Fig. 5) and the trees (Figs. 4 and 6). The sexual accession (H031), colored black in Figs. 4, 5, and 6, remained completely isolated in the NJ and UPGMA analyses. The coefficients of dissimilarity for all *B. humidicola* genotypes ranged from 0.02 to 0.89, with an average value of 0.60. Approximately 65% of the dissimilarity coefficients were

equal to 0.66 ± 0.05 . In the NJ tree and UPGMA dendrogram, the branches were supported by high bootstrap values that were equal to 100 in the main ramifications of groups II, III, and IV. The genetic diversity drawn in the UPGMA dendrogram presented a high cophenetic correlation ($r = 0.99$), thus indicating little distortion between the dendrogram and its original dissimilarity matrix.

Geographical origin and population structure

To evaluate whether the observed population structure in this germplasm collection was associated with the geographic distribution of origin sites on the African continent, the correlation between the geographic distance matrix and the genetic similarity matrix was estimated for accessions with known sampling locations. The Mantel test resulted in $r = 0.02$, thus revealing no significant association between genetic and geographic variation. A graphical representation of this result is shown in Fig. 6, in which accessions in the UPGMA dendrogram and in the STRUCTURE analysis are linked to their collection sites in Africa. In general, only the group that is colored green in the UPGMA dendrogram (cluster II of the STRUCTURE analysis) corresponded to individuals from the same locality. In the yellow group (cluster III generated by STRUCTURE), the number of accessions with known geographic coordinates was too small to infer any trend. In contrast, the orange group (cluster IV from STRUCTURE) comprised three accessions with clearly distinct origins. Accessions shown in red (cluster I of STRUCTURE) were sparsely spread throughout four African countries, from Zimbabwe in the south to Ethiopia in the north.

Fig. 5. Principal coordinate analysis (PCA). Plot of PCA axes 1 and 2 based on genetic distance calculated for the 60 individuals of *B. humidicola* using 27 microsatellite loci. Individuals are identified by sequential numbers that correspond to AN (annotation numbers) in Table 1. Spot colors represent groups identified in Fig. 2: red, cluster I; green, cluster II; yellow, cluster III; orange, cluster IV; and black, cluster V. The last cluster is represented by only one accession, which is the sole sexual accession indicated in Table 1 (H031).



Discussion

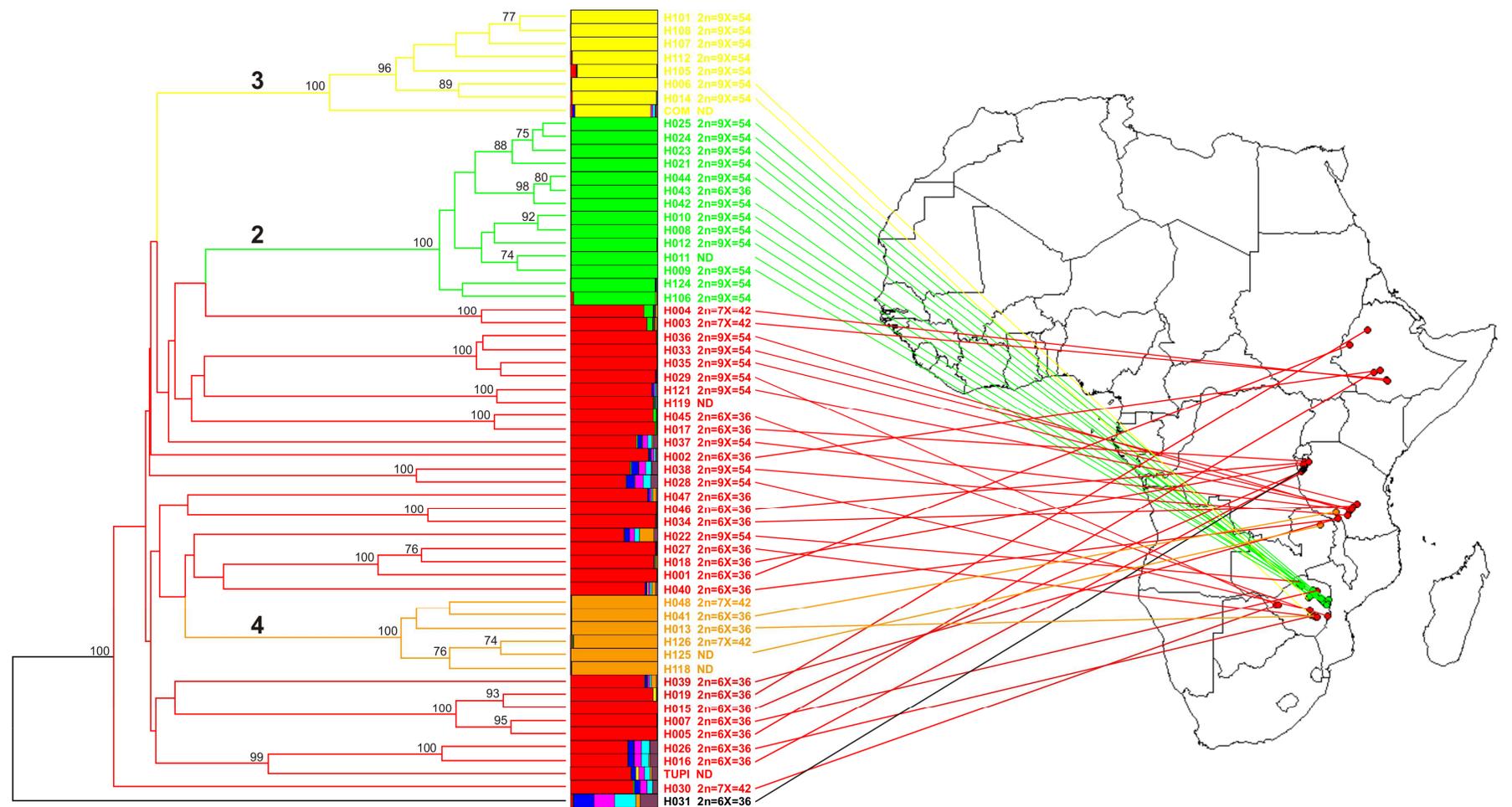
The germplasm of *B. humidicola* that was evaluated in this manuscript represented a challenge to the breeding program of this species. Though this collection was established in the mid-1980s, apomictic reproduction and limited knowledge of the ploidy of the material delayed the initiation of breeding. Only recently, with the availability of basic

knowledge of the chromosome behavior and the mode of reproduction of almost all of the accessions, could this germplasm be exploited for breeding purposes.

Brachiaria humidicola reproduces mainly by apospory, one of the types of apomixis defined by Nogler (1984). For *B. humidicola*, apomixis is facultative in most genotypes, and a meiotically derived sac may be present along with an aposporous sac in the same ovule or in different ovules of the same plant. As described for other species of *Brachiaria* (Lutts et al. 1994; Dusi and Willemse 1999; Savidan 2000), precocious development of aposporous sacs results in prevailing apomictic reproduction, even when a high percentage of ovules contain a meiotically derived sac. Apomixis prevails in 57 of the wild accessions of this *B. humidicola* collection, whereas only one accession (H031) reproduces by sexual means (do Valle 1990). Consequently, the possibilities of crosses are limited because H031 is the sole accession that can be used as a female pollen receptor.

Variation in ploidy is also an obstacle for crossing accessions. According to the data presented in Table 1, of the 57 apomictic accessions, only 20 have the same chromosome number ($2n = 36$) and ploidy level ($2n = 6x$) as H031. In a previous study, Ferguson and Crowder (1974) described the limitations of crosses of *Brachiaria* genotypes with different ploidies. For breeding purposes, crosses between individuals with different chromosome numbers and (or) distinct meiotic behaviors usually result in progeny infertility. Thus, the possibility of generating novel variation through controlled crosses, which should bring new perspectives for breeding this species, is restricted to less than half of the available germplasm variability. Therefore, knowledge of the genetic basis of this variability is an important tool in designing a breeding scheme focused on the possible exploitation of heterosis in *B. humidicola*.

Fig. 6. UPGMA tree showing accessions and cultivars grouped by Jaccard's similarity. Between the lines of branches and accession names, the results from Fig. 3 are inserted. Bootstrap values > 70% are displayed in branches. Chromosome counts and ploidy levels (Table 1) are indicated. Accessions with geographic coordinates available in the Forages database at CIAT are linked to collection sites, indicated on the African continent map using DIVA-GIS 5.2.0.2. For reference, the names of countries are listed in Table 1. Columns from Fig. 3 were ordered to match the respective accessions of the dendrogram using CoreIDRAW 11.633 software.



In the present study, analysis of microsatellite loci allowed the assessment of the genetic diversity in 58 accessions and two commercial cultivars of *B. humidicola*. Molecular data generated for these genotypes were subjected to analyses using both Jaccard's similarity and prior models tested with Bayesian statistics. Pritchard et al. (2000) discussed the suitability of using distance-based methods and model-based methods for dealing with genetic data of a sample of individuals. These authors stressed the advantages of the fine statistical inference that can be made using model-based approaches and indicated how the comparison between these two types of results could be useful for obtaining biologically suitable clues about the genetic diversity of a data set. For the data from *B. humidicola* used in this study, distance-based methods could not be applied because allele frequencies at microsatellite loci could not be estimated owing to the high ploidy levels of the genotypes. As an alternative, we used similarity-based methods.

In this work, the two methods we applied were complementary. Clusters formed using STRUCTURE software supported groups resulting from similarity matrices, and the model-based results revealed information that could not be accessed with the similarity-based grouping methodology.

The population structure identified in the Bayesian analysis was consistent with the expectation that the sexual accession should not cluster together with the apomictics. The sexual accession, H031, was revealed to be an admixture of distinct allelic pools not shared with most of the accessions (Fig. 2). Of the individuals sharing alleles with H031, only H016 was collected in the same region (Burundi, 39 km apart). The remaining accessions were collected from locations at least 700 km away from H031.

In the three strongly supported groups obtained with similarity-based methods (II, III, and IV) (Figs. 4, 5, and 6), H031 did not group with any other accession. However, in the PCA

analysis, the grouping pattern depended on the axes used to create plots (data not shown). Together with the Bayesian results, these findings clearly reflect the amplification profile of microsatellites in the analyzed genotypes. Discrimination between sexual and apomictic genotypes has been described using similarity-based methods for *Paspalum notatum* based on RAPD (Daurelio et al. 2004) and AFLP (Espinoza et al. 2006) markers.

Though only one sexual genotype was analyzed, and no previous data on the *B. humidicola* genome using these microsatellite loci are available at the moment, further research in a segregating population that was obtained from sexual x apomictic crosses of hexaploid *B. humidicola* is underway by our group in an attempt to investigate linkage of these loci occurring through apomixis. For marker-assisted selection, loci containing alleles that are exclusive to the apomictic accessions will be useful for early identification of interspecific hybrids. In the *B. humidicola* breeding program, these loci represent a possibility of shortening time and costs by allowing the identification of the mode of reproduction in progeny without the need for ovary evaluation.

To better explore heterosis in this germplasm collection, controlled crosses using H031 as the female parent should focus on accessions belonging to clusters II and IV (respectively green and yellow in Figs. 2, 4, 5, and 6), which did not share alleles with the sexual accession. Considering the limits imposed by ploidy differences, only H043 (group II) can be used as a pollen donor in these crosses. The exploitation of genetic variability using the nonaploid accessions of cluster II and the accessions allocated in cluster IV will rely on novel breeding strategies to bypass ploidy differences. Crosses between accessions belonging to cluster I (shown in red in Figs. 2, 4, 5, and 6) are likely to increase genetic gains if they are focused on genotypes that do not share allelic pools with H031.

The cultivars Tupi and COM appear to have highly divergent genetic backgrounds. Both are apomictic and were allocated into distinct clusters or groups. Because the cultivar COM has 54 chromosomes and is not compatible with the sole sexual accession, chromosome counting and evaluation of metaphasic behavior in Tupi could be helpful in determining cytogenetic compatibility for crosses with H031. If such crosses were viable, agronomic traits of interest for each of these cultivars could be transferred to the progeny, and the superior sexual descendents could be subsequently intercrossed.

Cytological studies in the accessions of this *B. humidicola* collection revealed the presence of genotypes with $2n = 36$, 42 , and 54 chromosomes and suggested $x = 6$ as the basic chromosome number for this species (Boldrini et al. 2009, 2010). In Fig. 6, all but one of the accessions with a known origin belonging to group II have 54 chromosomes (nonaploids) and were collected in the same region in Zimbabwe. Additionally, all accessions in group III have 54 chromosomes. Because it was not possible to retrieve the coordinates of collection sites for most of the accessions, no correlation with geographical origin could be established within this group. Accessions from cluster I (shown in red in Figs. 2, 4, 5, and 6) were collected in a wide north–south range on the African continent, and they include hexa-, hepta-, and nonaploids, indicating that neither genetic diversity nor ploidy level is correlated with geographical origin.

Boldrini et al. (2009) suggested that the apomictic accession H030 is an allopolyploid resulting from a hybridization process in which a male apomictic hexaploid genitor ($2n = 6x = 36$) contributed an unreduced number of gametes ($n = 36$) and a female sexual diploid ($2n = 2x = 12$) contributed $n = 6$. The results presented herein indicate that unreduced gametes and hybridization involving this sexual diploid putative ancestor may have contributed to the evolution of the nonaploid accessions H022, H028, H037, and H038. Furthermore, polyploidization events could have led to the formation of the sexual hexaploid H031. If such is

the case, two questions remain unanswered. First, how could this sexual diploid ancestor have participated in the formation of hexaploid apomictic accessions that present allelic sets shared with H031 (e.g., H002, H016, H026, H040, and H047)? We believe that further studies using molecular cytogenetic analyses will help to answer this question. Second, why did we not find a correlation between the genetic background of accessions and their geographical origin? For this purpose, a deeper analysis of the ecological aspects of dispersion of this plant material throughout the African continent should be carried out. In addition, pastoral activities and the migration of grazing animals in Africa may have contributed to the dispersion of grass species. Leitch and Leitch (2008) suggested that polyploid-induced changes in plant genomes can generate individuals that are able to exploit new niches or outcompete progenitor species. Genome plasticity resulting from polyploidization would then be the major force driving the adaptation of these accessions to diverse environments, whereas apomixis would have fixed the adapted genetic status of these genotypes.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Mateus Mondin for contributing to the discussion of this manuscript. This work was supported by grants from the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA, 02.05.2.10.00.02.01 and 01.06.1.07.05.06.02), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 482458/2007-0 and 478262/2004-3), the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2010/ 51010-0), and the Foundation for Science and Technological Development of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT, 41/100165/2004). We are also grateful to FAPESP for undergraduate (2007/57022-5) and graduate (2006/52953-8) fellowships to B.B.Z.V and A.C.B.S., respectively, and to CNPq for a research fellowship (307430/2007-3) awarded to A.P.S.

References

Assis, G.M.L. 2001. Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. M.Sc. dissertation, Genetics and Breeding Graduate Program, University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Assis, G.M.L., Euclides, R.F., Cruz, C.D., and do Valle, C.B. 2003. *Brachiaria* species discrimination based on different groups of morphological traits. *Braz. J. Anim. Sci.* 32(3): 576–584. doi:10.1590/S1516-35982003000300009.

Boldrini, K.R. 2009. Acessos poliplóides, níveis ímpares de ploidia e assincronia na meiose como evidências citológicas de número básico de cromossomos $x = 6$ em *Brachiaria humidicola* (Poaceae). Ph.D. thesis, Biological Sciences Graduate Program, University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

Boldrini, K.R., Micheletti, P.L., Gallo, P.H., Mendes-Bonato, A.B., Pagliarini, M.S., and Valle, C.B. 2009. Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genet. Mol. Res.* 8(3): 888–895. doi:10.4238/vol8-3gmr617. PMID:19731211.

Boldrini, K.R., Pagliarini, M.S., and do Valle, C.B. 2010. Evidence of natural hybridization in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *J. Genet.* 89(1):91–94. PMID:20505251.

CIAT. 2009. The FORAGES database [online]. International Center for Tropical Agriculture, Cali, Valle del Cauca, Colombia. Available from <http://isa.ciat.cgiar.org/urg/main.do?language=en> [accessed 1 April 2009].

Coelho, A.S.G. 2000. BOOD version 3.0. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Daurelio, L.D., Espinoza, F., Quarin, C.L., and Pessino, S.C. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Syst. Evol.* 244(3–4): 189–199. doi:10.1007/s00606-003-0070-6.

Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.

Dusi, D.M.A., and Willemse, M.T.M. 1999. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biol. Cracov. Ser.; Bot.* 41: 151–162.

Ersts, P.J. 2009. Geographic Distance Matrix Generator [computer program]. Version 1.2.3. American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg [accessed 1 April 2009].

Espinoza, F., Daurelio, L.D., Pessino, S.C., Valle, E.M., and Quarin, C.L. 2006. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Syst. Evol.* 258(3–4):147–159. doi:10.1007/s00606-005-0401-x.

Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14(8): 2611–2620. doi:10.1111/j. 1365-294X.2005.02553.x. PMID:15969739.

Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics*, 1: 47–50. PMID:19325852.

Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4): 1567–1587. PMID:12930761.

Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes*, 7(4): 574–578. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x. PMID:18784791.

Ferguson, J.E., and Crowder, L.V. 1974. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Crop Sci.* 14(6): 893–895.

Ferreira, M.E. 2003. Melhoramento genético do arroz: impactos da genômica. In *Melhoramento Genômico*. Edited by A. Borém, M. Giúdice, and T. Sedyama. Universidade Federal de Viçosa Press, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. pp. 73–127.

Gavrilenko, T., Antonova, O., Ovchinnikova, A., Novikova, L., Krylova, E., Mironenko, N., et al. 2010. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National cultivated potato collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* doi:10.1007/s10722-010-9554-8.

Grisebach, A. 1853. Gramineae. In *Flora rossica*. Vol. 4. Edited by C.F. Ledebour. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany. pp. 324–484.

Hartings, H., Berardo, N., Mazzinelli, G.F., Valoti, P., Verderio, A., and Motto, M. 2008. Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. *Theor. Appl. Genet.* 117(6): 831–842. doi:10.1007/s00122-008-0823-2. PMID: 18584146.

Hijmans, R.J., Guarino, L., Cruz, M., and Rojas, E. 2001. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genet. Resour. Newsl.* 127: 15–19.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223–270.

Jungmann, L., Vigna, B.B.Z., Paiva, J., de Sousa, A.C.B., do Valle, C.B., Laborda, P.R., et al. 2009. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Conserv. Genet. Resour.* 1(1): 475–479. doi:10.1007/s12686-009-9111-y.

Leitch, A.R., and Leitch, I.J. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, 320(5875): 481–483. doi:10.1126/science.1153585. PMID:18436776.

Liu, J., Liu, L., Hou, N., Zhang, A., and Liu, C. 2007. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica*, 155(1– 2): 249–258. doi:10.1007/s10681-006-9326-x.

Lutts, S., Ndikumana, J., and Louant, B.P. 1994. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F₁ hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. *Euphytica*, 78(1–2): 19–25 . doi:10.1007/BF00021394.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27(2 Part 1): 209–220. PMID:6018555.

Miles, J.W., do Valle, C.B., Rao, I.M., and Euclides, V.P. 2004. *Brachiaria* grasses. In Warm-season (C4) grasses. *Agronomy Series of Monographs* 45. Edited by L.E. Moser, B.L. Burson, and L.E. Sollenberger. American Society of Agronomy, Madison, Wis. pp. 745–783.

Nogler, G.A. 1984. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. 5. Conclusion. *Bot. Helv.* 94(2): 411–422.

Nybom, H. 1994. DNA fingerprinting — a useful tool in fruit breeding. *Euphytica*, 77(1–2): 59–64. doi:10.1007/BF02551462.

Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. DARwin: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows [computer program]. Version 5.0.157. Available from <http://darwin.cirad.fr/darwin> [accessed 1 April 2009].

Perrier, X., Flori, A., and Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. In Genetic diversity of cultivated tropical plants. Edited by P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, and J.C. Glaszmann. Enfield, Science Publishers, Montpellier, He´rault, France. pp. 43–76.

Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–959. PMID:10835412.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analyses systems. Version 2.10m. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, N.Y.

Sakiroglu, M.S., Doyle, J.J., and Brummer, E.C. 2010. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* doi:10.1007/s00122-010-1319-4.

Savidan, Y.H. 2000. Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 18: 13–86.

Torres González, A.M., and Morton, C.M. 2005. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37(1): 36–44. doi:10.1016/j.ympev.2005.06.003. PMID:16039145.

Trinius, C.B. 1834. Panicearum genera retractavit speciebusque compluribus illustravit. *Sciences Nat.* 1: 89–355. [The copy in the Smithsonian libraries, dated June 1834 in pencil, is paginated from 1 through 267, and the title page indicates neither city nor publisher. It is a preprint of the paper with the same title in the following: 1835, *Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg*, sixth series (Sciences Naturelles).]

do Valle, C.B. 1990. Coleção de germoplasma de espécies de Brachiaria no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Available from Embrapa Gado de Corte (www.cnpqg.embrapa.br), Série Documentos No. 46 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Zhang, K., and Rosenberg, N.A. 2007. On the genealogy of a duplicated microsatellite. *Genetics*, 177(4): 2109–2122. doi:10.1534/genetics.106.063131. PMID:17947445.

Zhang, L.-H., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovich, S., Dean, R., and Hanna, W. 1999. Differentiation of Bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. *Theor. Appl. Genet.* 98(6–7): 895–902. doi:10.1007/s001220051148.

Supplementary Table S1: Estimated membership coefficients for each individual, for $K = 8$, calculated by STRUCTURE version 2.2 using a model that assumes no-admixture and correlated allelic frequencies for Figures 2 and 3.

ID ^a		Percentage of allelic pools in the composition of each individual (labeled as colors of Figures 2 and 3)							
AN ^b	EBC ^c	Red	Green	Dark blue	Yellow	Magenta	Light blue	Orange	Purple
1	H001	0.990	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001
2	H002	0.892	0.005	0.024	0.005	0.024	0.025	0.004	0.022
3	H003	0.873	0.065	0.010	0.003	0.010	0.010	0.018	0.010
4	H004	0.842	0.108	0.006	0.006	0.006	0.006	0.020	0.006
5	H005	0.992	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001
6	H006	0.004	0.005	0.001	0.987	0.001	0.001	0.002	0.001
7	H007	0.990	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001
8	H008	0.001	0.995	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001
9	H009	0.001	0.995	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
10	H010	0.001	0.997	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	H011	0.001	0.997	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	H012	0.004	0.986	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001
13	H013	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.990	0.001
14	H014	0.017	0.001	0.002	0.963	0.001	0.002	0.013	0.001
15	H015	0.993	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
16	H016	0.656	0.002	0.065	0.007	0.081	0.088	0.009	0.090
17	H017	0.970	0.009	0.003	0.004	0.003	0.003	0.005	0.003
18	H018	0.955	0.002	0.003	0.015	0.003	0.003	0.018	0.003
19	H019	0.944	0.001	0.003	0.037	0.004	0.003	0.004	0.003
20	H021	0.002	0.992	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
21	H022	0.609	0.009	0.056	0.002	0.059	0.054	0.165	0.047
22	H023	0.001	0.997	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	H024	0.001	0.996	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
24	H025	0.002	0.995	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
25	H026	0.656	0.004	0.067	0.003	0.082	0.088	0.008	0.091
26	H027	0.977	0.001	0.003	0.002	0.003	0.003	0.009	0.002
27	H028	0.630	0.010	0.095	0.004	0.094	0.083	0.003	0.081
28	H029	0.983	0.007	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002
29	H030	0.718	0.013	0.063	0.002	0.076	0.064	0.003	0.060
30	H031	0.027	0.002	0.238	0.004	0.235	0.239	0.053	0.202
31	H033	0.986	0.004	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002
32	H034	0.975	0.005	0.003	0.001	0.003	0.003	0.007	0.003
33	H035	0.991	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
34	H036	0.983	0.007	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002
35	H037	0.754	0.012	0.054	0.004	0.058	0.053	0.015	0.052
36	H038	0.683	0.014	0.080	0.005	0.078	0.068	0.002	0.070

Supplementary Table S1: Continued

ID ^a		Percentage of allelic pools in the composition of each individual (labeled as colors of Figures 2 and 3)							
AN ^b	EBC ^c	Red	Green	Dark blue	Yellow	Magenta	Light blue	Orange	Purple
37	H039	0.847	0.006	0.022	0.007	0.021	0.022	0.054	0.021
38	H040	0.852	0.004	0.022	0.011	0.022	0.020	0.047	0.022
39	H041	0.004	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.991	0.001
40	H042	0.001	0.997	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
41	H043	0.001	0.997	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
42	H044	0.001	0.995	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
43	H045	0.943	0.036	0.002	0.006	0.002	0.002	0.007	0.002
44	H046	0.979	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003
45	H047	0.882	0.002	0.019	0.003	0.017	0.017	0.044	0.016
46	H048	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.992	0.001
47	H101	0.001	0.001	0.000	0.997	0.000	0.000	0.001	0.000
48	H105	0.061	0.007	0.004	0.914	0.004	0.004	0.002	0.004
49	H106	0.032	0.941	0.003	0.010	0.003	0.003	0.005	0.003
50	H107	0.002	0.001	0.001	0.994	0.000	0.001	0.001	0.000
51	H108	0.001	0.001	0.000	0.997	0.000	0.000	0.001	0.000
52	H112	0.012	0.003	0.002	0.978	0.002	0.002	0.001	0.002
53	H118	0.005	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001	0.989	0.001
54	H119	0.949	0.002	0.013	0.001	0.011	0.011	0.001	0.012
55	H121	0.929	0.006	0.017	0.001	0.015	0.015	0.001	0.015
56	H124	0.007	0.958	0.007	0.002	0.008	0.008	0.003	0.008
57	H125	0.002	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.994	0.000
58	H126	0.008	0.017	0.001	0.002	0.001	0.001	0.970	0.001
59	COM	0.017	0.003	0.026	0.869	0.025	0.026	0.011	0.023
60	TUPI	0.690	0.004	0.051	0.035	0.064	0.070	0.015	0.070

^aID: Identification of accessions and cultivars^bAN: annotated number for analysis in STRUCTURE (Figure 3)^cEBC: Identification of accessions at of Embrapa Beef Cattle

CAPÍTULO III

Construção de um mapa genético e mapeamento da aposporia para a gramínea hexaplóide *Brachiaria humidicola*, uma forrageira tropical

Vigna, B.B.Z.¹; Jungmann, L.²; Valle, C. B. do²; Alleoni, G.C.¹; Pastina, M.M.³; Gazaffi, R.³,
Mollinari, M.³; Mendonça, S.A.², Bitencourt, G.A.², Peixoto, L.T.², Paniago, B.C.², Ricci,
G.L.⁴, Souza-Kaneshima, A. M.⁴, Pagliarini, M.S.⁴; Garcia, A.A.F.³; Souza, A.P.^{1,5}.

¹ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), CP 6010, CEP 13083-970, Campinas - SP, Brasil.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Corte - CNPQC. Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CP 154, CEP 79002-970, Campo Grande - MS, Brasil.

³ Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Genética. CP 83, CEP 13400-970 - Piracicaba, SP - Brasil

⁴ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular e Genética, Av. Colombo, 5790, Zona 7, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

⁵ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal (DBV), CP6109, CEP 13083-970, Campinas - SP, Brasil.

Resumo

Este estudo descreve o primeiro mapa de ligação para uma gramínea tropical do gênero *Brachiaria* com base em marcadores em dose única (MDU) derivadas de novos microssatélites desenvolvidos para *Brachiaria humidicola*. A população de mapeamento consiste em uma progênie F₁ de irmãos completos com 279 indivíduos, oriundos de um cruzamento intra-específico de *B. humidicola* entre o acesso sexual H031 e a cultivar apospórica BRS Tupi. Foram desenvolvidos 127 novos microssatélites e para o mapa, foram utilizados 19 locos microssatélites já publicados e 60 novos marcadores polimórficos para o cruzamento. O mapa consiste em 124 MDUs distribuídos em 38 grupos de ligação, cobrindo 1.543,8cM do genoma hexaplóide ($2n=6x=36$), com uma marca a cada 12,3cM. Foram encontrados dois grupos de homologia, ambos com sete grupos de ligação, número próximo do esperado para $x=6$, entretanto, 24 grupos de ligação permaneceram não agrupados. O modo de reprodução por aposporia foi fenotipado em 270 indivíduos da progênie e a aposporia foi mapeada em um único grupo de ligação, de acordo com o esperado, por provavelmente estar associada a uma região genômica específica associada à aposporia (ASGR). Com base no perfil de amplificação dos locos microssatélite, na proporção de marcadores ligados em repulsão e acoplamento e em dados sobre o comportamento meiótico de 45 desses híbridos, podemos sugerir que os genótipos hexaplóides desta espécie tenham origem autoalopoliplóide, corroborando alguns estudos citogenéticos e moleculares para a espécie.

Palavras-chave: marcadores microssatélites – mapa de ligação – apomixia – poliploidia – *Urochloa humidicola*

Introdução

A espécie africana *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick (sinônimo *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga) é uma gramínea forrageira perene, estolonífera e de estabelecimento rápido (Keller-Grein *et al.*, 1996). Esta espécie foi introduzida no Brasil na década de 1960 e, por se adaptar a ambientes úmidos e suportar solos encharcados, foi utilizada como alternativa às outras braquiárias, geralmente adaptadas a solos secos (Jungmann & Vigna *et al.*, 2010; Capítulo II).

Brachiaria humidicola é uma espécie poliplóide, com número cromossômico básico $x=6$ (Adamowski *et al.*, 2007; Boldrini *et al.*, 2009a; b; 2010), e apresenta reprodução por apomixia (Valle & Savidan, 1996). Estudos citogenéticos e moleculares em diferentes espécies do gênero *Brachiaria* sugerem hibridização e formação de gametas não-reduzidos no processo de formação dessas espécies poliplóides (Boldrini *et al.*, 2006a; 2006b; 2009a; 2009b; 2010; Mendes *et al.*, 2006; Gallo *et al.*, 2007; Nielen *et al.*, 2010), porém, ainda não se conhece a origem da poliploidia neste gênero.

A apomixia é um tipo de reprodução assexuada por sementes que leva à geração de progênies clonais (Nogler, 1984). A apomixia no gênero *Brachiaria* é caracterizada pela presença de sacos embrionários apospóricos derivados de células do nucelo, pelo desenvolvimento partenogenético do embrião e pela formação do endosperma após a fertilização do núcleo polar (pseudogamia) (Valle & Savidan, 1996). O desenvolvimento precoce dos sacos apospóricos (Lutts *et al.*, 1994; Dusi & Williamse, 1999) resulta no predomínio da reprodução apomítica, mesmo quando uma alta porcentagem de óvulos apresenta um saco embrionário derivado da meiose (Savidan, 2000). Estudos genéticos e moleculares neste gênero mostraram que a aposporia é controlada por um único loco dominante (Miles & Escandon, 1997; Pessino *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998).

O mapeamento genético da aposporia foi realizado nas gramíneas forrageiras tropicais *Panicum maximum* (Ebina *et al.*, 2005) e *Paspalum notatum* (Stein *et al.*, 2007) e, em ambos os casos, a aposporia foi mapeada em um único grupo de ligação. Para as gramíneas *Pennisetum squamulatum* e *Cenchrus ciliaris*, os estudos relacionados à aposporia estão bem avançados e descrevem uma região genômica associada à aposporia (ASGR, do inglês *Apospory-Specific Genomic Region*), que seria conservada e não sofreria recombinação (Ozias-Akins *et al.*, 1998; 2003; Akiyama *et al.*, 2005; Goel *et al.*, 2006; Gualtieri *et al.*, 2006; Conner *et al.*, 2008; Huo *et al.*, 2009). Entretanto, para o gênero *Brachiaria*, existem poucos estudos. Pessino *et al.* (1997; 1998) realizaram uma análise de bulks segregantes em híbridos inter-específicos de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, onde a região do apo-loco foi mapeada detalhadamente com marcadores RFLP, RAPD e AFLP. Para *B. humidicola*, Zorzatto *et al.* (2010) encontraram um marcador RAPD a 4,6cM do apo-loco por meio de uma análise de bulks segregantes em 100 híbridos intra-específicos.

O mapeamento em poliplóides é mais complexo que em diplóides devido ao grande número de possíveis genótipos, às dificuldades associadas à identificação destes genótipos e ao escasso conhecimento acerca do tipo de poliploidia em muitas espécies (Ripol *et al.*, 1999). Wu *et al.* (1992) desenvolveram um método baseado na análise da segregação de marcadores em dose única (MDU). Neste método, o marcador em dose única está presente em uma única cópia, em apenas um dos dois genitores envolvidos em um cruzamento, apresentando segregação na progênie na proporção de 1:1, independentemente do nível e do tipo de ploidia. Marcadores em dose única em ambos os genitores segregando na progênie na proporção 3:1 também podem ser utilizados no mapeamento, sendo usados também para a integração dos mapas dos genitores que são obtidos quando apenas locos 1:1 são usados. Dessa forma, o mapeamento em poliplóides se dá, basicamente, em duas etapas: ordenação dos locos em cromossomos individuais (grupos de ligação, GL), com eventual integração dos

mapas, e a designação desses GL em grupo de homologia (GH) (Ripol *et al.*, 1999). Os homólogos podem ser identificados por meio de marcadores que reconhecem vários MDU em um mesmo loco (Da Silva *et al.*, 1993), através de marcadores em dose-múltipla (Ripol *et al.*, 1999) ou através da detecção de ligação em fase de repulsão entre marcadores localizados em cromossomos homólogos (Al Janabi *et al.*, 1993). Mapas genéticos em espécies poliplóides baseados em MDU foram desenvolvidos para várias espécies de gramíneas, como *Poa pratensis* (Porceddu & Albertini *et al.*, 2002), *Pennisetum ciliare* (Jessup *et al.*, 2003), *Festuca arundinacea* (Saha *et al.*, 2005), *Panicum maximum* (Ebina *et al.*, 2005), *Cynodon sp.* (Bethel *et al.*, 2006) e *Paspalum notatum* (Stein *et al.*, 2007), *Saccharum spp.* (Oliveira *et al.*, 2007) e *Panicum virgatum* (Okada *et al.*, 2010).

Além da poliploidia, a apomixia também interfere no mapeamento genético da espécie, pois não permite a obtenção de linhagens endogâmicas. Dessa forma, o mapeamento deve ser feito em uma progênie de irmãos-completos, originada a partir de genitores heterozigotos, onde segregam muitos alelos por loco e a fase de ligação dos locos nos genitores é geralmente desconhecida (Maliapaard *et al.*, 1997).

Estudos anteriores utilizaram marcadores moleculares como ferramenta para o melhoramento genético de *B. humidicola*. A diversidade genética do banco de germoplasma da espécie foi analisada por Chiari *et al.* (2007b) com marcadores RAPD, e Jungmann & Vigna *et al.* (2010, Capítulo II) com marcadores SSR. Entretanto, até o momento não foi desenvolvido um mapa de ligação para *B. humidicola*.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um mapa genético de *B. humidicola* hexaplóide, com marcadores microssatélites, para ser usado em estudos genéticos básicos sobre a apomixia, a evolução do genoma da espécie e o comportamento genômico em híbridos, e fornecer informações para o programa de melhoramento genético da espécie e também do gênero *Brachiaria*. Tal mapa também

pode ser usado no futuro para trabalhos de mapeamento de QTLs (locos que controlam a variação de caracteres quantitativos).

Material e Métodos

População de mapeamento

Como parte do programa de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte - Campo Grande/MS, um cruzamento intra-específico entre o acesso sexual BRA005811-H31 e a cultivar apomítica *B. humidicola* cv. BRS Tupi (doador de pólen), ambos hexaplóides ($2n=6x=36$), foi realizado pela pesquisadora Dra. Cacilda Borges do Valle (Embrapa Gado de Corte). Foi gerada uma progênie de irmãos-completos com um total de 364 indivíduos F_1 , a partir da qual foram identificados 279 híbridos F_1 por RAPD (Chiari *et al.* 2007a; Bitencourt *et al.*, 2008). Estes híbridos foram utilizados para a construção do mapa de ligação. Esta população está sendo mantida no campo na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS, desde 2005.

Amostras de folhas jovens de cada um dos híbridos, bem como de seus genitores, foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80°C até que fossem liofilizadas e moídas em moinho mecânico. O DNA total foi extraído de acordo com o método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle & Doyle, 1987).

Desenvolvimento de novos marcadores do tipo microssatélite

A partir de uma biblioteca enriquecida em microssatélites previamente construída por Jungmann *et al.* (2009b, Capítulo I), foram desenvolvidos novos marcadores microssatélites. Os marcadores foram amplificados e resolvidos por

eletroforese de acordo com metodologia descrita por Jungmann *et al.* (2009b, Capítulo I) em seis híbridos da população de mapeamento, juntamente com os genitores do cruzamento, a fim de verificar o polimorfismo dos locos na população.

Identificação do modo de reprodução

A partir de flores coletadas em antese, foram dissecados sessenta óvulos de cada híbrido, os quais foram clarificados usando metil salicilato, de acordo com o protocolo de Young *et al.* (1979). Pelo menos 50 óvulos clarificados foram analisados por planta usando um microscópio com contraste de interferência (Zeiss Axiophot). Foi analisado um total de 270 indivíduos da progênie (Bitencourt *et al.*, 2007; Valle *et al.*, 2008). Um teste de Qui-quadrado foi realizado na progênie para verificar se a segregação de plantas sexuais e apomíticas está de acordo com o modelo esperado de herança monogênica para este caráter.

Notação dos marcadores

Os marcadores microssatélites foram identificados com o nome da instituição em que foram desenvolvidos seguidos de numeração seqüencial crescente, a partir de marcadores previamente desenvolvidos por Jungmann *et al.* (2009b, Capítulo I).

Para a construção do mapa, as marcas foram nomeadas com a sigla Bhx-y-z, onde “x” corresponde ao número do marcador, “y” corresponde à marca amplificada dentro daquele marcador e “z” corresponde à origem do polimorfismo do genitor. A origem do polimorfismo do genitor foi designada de acordo com a notação de Wu *et al.* (2002): “D1” marca heterozigota para BRA005811-H31 e homozigota para *B. humidicola* cv. BRS Tupi com a configuração do cruzamento do tipo “ao x oo”, “D2” marca homozigota para BRA005811-H31 e heterozigota para *B. humidicola* cv. BRS Tupi com a

configuração do cruzamento do tipo “oo x ao” e “C” marca heterozigota em ambos os genitores com a configuração do cruzamento do tipo “ao x ao”. O alelo de dose única (*simplex*) é simbolizado pela letra “a” e é dominante em relação ao alelo nulo (*nulliplex*), simbolizado pela letra “o”. As notações “D1” e “D2” referem-se às marcas em configuração *testcross* entre os genitores e segregam numa razão 1:1 enquanto que “C” refere-se a locos heterozigotos em ambos os genitores que segregam numa razão 3:1, com o mesmo genótipo em ambos os genitores. Para a notação dos grupos de homologia (GHs), cada GH recebeu um número romano.

Segregação dos marcadores

Cada alelo foi avaliado independentemente como um marcador dominante, baseado na presença (1) ou ausência (0) em cada um dos 279 híbridos F₁ e nos genitores do cruzamento. Devido à natureza poliplóide da espécie estudada, somente marcadores em dose única (Wu *et al.*, 2002) foram utilizados para a construção do mapa de ligação. Assim, para a identificação dos marcadores que apresentavam as segregações 1:1 e 3:1, esperadas para marcas em dose única em apenas um dos genitores (configuração *testcross*) e marcas em dose-única em ambos os genitores, respectivamente, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Marcadores com distorções em relação a segregação esperada foram desconsiderados das análises. Para evitar a ocorrência do erro tipo I, ou seja, identificação de falsos positivos, em que rejeita-se a hipótese H₀ quando esta é verdadeira, foi utilizada a correção de Bonferroni para múltiplos testes, considerando nível global de significância com valor 0,05. Marcas com desvio das proporções esperadas após a correção não foram incluídas na análise, uma vez que podem indicar locos com doses mais altas.

Análise de ligação e construção do mapa

A análise de ligação e construção do mapa foram realizadas através do *software* OneMap (Margarido *et al.*, 2007), desenvolvido com base nos procedimentos propostos por Wu *et al.* (2002) mas recentemente expandido para incluir abordagem multiponto baseada em cadeias de Markov. A análise de dois pontos foi realizada utilizando, como critérios para a formação dos grupos de ligação, LOD-Score igual a 5 (considerando, portanto, a ocorrência de múltiplos testes baseado no número de combinações dois a dois possíveis) e 30cM (Kosambi, 1944) para a fração de recombinação. Os grupos de marcadores ligados foram então ordenados usando o comando *compare*, para grupos de ligação com até seis marcadores, no qual as diferentes ordens possíveis de marcadores foram comparadas com base em suas respectivas verossimilhanças. Para grupos maiores, o comando *compare* torna-se computacionalmente inviável. Neste caso, o comando *order* foi então utilizado, cujos resultados foram verificados através do comando *ripple*, quando necessário. Para a formação dos grupos de homologia (GH), os grupos de ligação (GL) foram agrupados com base na presença de alelos derivados de um mesmo microssatélite (loco definido pelo par de *primers* que flanqueia o microssatélite). O agrupamento com base em marcas ligadas em repulsão também foi utilizado para determinar os GH.

Resultados

Microssatélites

Foram desenvolvidos 127 novos marcadores microssatélites. Os novos locos desenvolvidos, o motivo da repetição, a temperatura de anelamento, o tamanho esperado dos produtos amplificados, as sequências dos *primers*, o número de bandas por

loco, a variação no tamanho dos fragmentos amplificados, além do polimorfismo e da utilização na população de mapeamento estão apresentados na Tabela 1. Além dos novos locos microssatélites desenvolvidos, os 27 locos publicados (Jungmann *et al.*, 2009b, Capítulo I) também foram analisados na população de mapeamento. Do total de 154 locos microssatélites desenvolvidos, 94 foram selecionados para o mapeamento (Tabela 1). Destes 94 locos, 15 apresentaram-se monomórficos entre os genitores e os indivíduos F_1 , não gerando informações úteis para a construção do mapa. Os outros 79 locos apresentaram-se polimórficos e amplificaram 374 marcas, com uma média de 4,7 marcas por loco (Tabela 2).

Algumas observações foram feitas com relação ao perfil de amplificação verificado nos locos analisados. Em 54% dos locos, observa-se a amplificação de duas regiões distintas do genoma, sendo que em muitos casos, uma região tem mais marcas do que a outra, dentro de um mesmo loco microssatélite. Além disso, em seis locos, o genitor H031 não amplifica (Figura 1).

Análise da segregação

Do total de marcas (374) amplificadas, 147 (39,4%) apresentaram polimorfismo entre os genitores e a segregação 1:1, esperada para marcas em dose simples na população de mapeamento (marcas do tipo D), enquanto que 17 marcas (4,8%) foram monomórficas entre os genitores (marcas do tipo C) e segregaram numa razão 3:1 na população de mapeamento. As marcas que não segregaram de acordo com o esperado (1:1 ou 3:1) foram consideradas marcadores com distorções de segregação e/ou com altas dosagens alélicas, não podendo, então, ser aproveitados para o mapeamento no presente momento, uma vez que métodos de mapeamento de locos em altas doses ainda são raros na literatura (Aitken *et al.*, 2007; Cervantes-Flores *et al.*, 2008) e baseados em princípios que dificultam a automatização das análises (Mollinari *et*

Tabela 1. Descrição dos marcadores microssatélites utilizados no mapeamento

Loco microssatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos primers (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP002*	(GT) ₃ ...(CTT) ₃ ...(GT) ₇ ...(CT) ₃	251	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	4	250-262	P	x	x
BhUNICAMP003*	(AC) ₆ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃	193	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	6	178-198	P	x	
BhUNICAMP004*	(GT) ₁₀ ...(GT) ₃	231	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	6	232-251	P	x	x
BhUNICAMP005*	(CA) ₈ T(AC) ₃	205	62	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	3	182-208	P	x	
BhUNICAMP007*	(TG) ₁₆ ...(GCA) ₄	201	57	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	3	178-200	P	x	
BhUNICAMP008*	(GA) ₁₈	264	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	3	250-262	P	x	x
BhUNICAMP009*	(AG) ₈	211	57	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	5	213-224	P	x	x
BhUNICAMP010*	(TG) ₆	198	55	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	5	178-200	P	x	x
BhUNICAMP012*	(GT) ₉ G(GA) ₅	166	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	2	164-168	P	x	x
BhUNICAMP015*	(GT) ₈	269	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	6	256-320	P	x	x
BhUNICAMP016*	(CT) ₆ (AT) ₆ (GT) ₉	266	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	8	268-298	P	x	x
BhUNICAMP018*	(AC) ₃ TC(AC) ₄	197	62	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	6	194-204	P	x	x
BhUNICAMP020*	(GCCG) ₃ ...(AC) ₉	231	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	3	238-249	P	x	x
BhUNICAMP021*	(AG) ₁₈	311	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	3	288-318	P	x	x
BhUNICAMP022*	(AG) ₁₇	223	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	2	204-222	P	x	x
BhUNICAMP023*	(CA) ₇	288	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	4	236-292	P	x	
BhUNICAMP024*	(CA) ₇	194	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	6	190-204	P	x	x
BhUNICAMP025*	(TC) ₃ (TG) ₅ (AG) ₅	184	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	9	184-228	P	x	x
BhUNICAMP026*	(GT) ₇	233	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	5	218-232	P	x	x
BhUNICAMP027	(CT) ₁₈	196	62	GCCGTTGGGTAGGAGAGGATTC GTGTAGCCGGCGTGTAGGTGTG	6	184-198	P	x	x
BhUNICAMP028	(AC) ₉	284	62	GACAGGGACGAAAGGAA GAATCAGTCAAGCCATCACC	8	270-288	P	x	x
BhUNICAMP029	(TC) ₈ ...(CCT) ₄ ...(CT) ₁₄	278	62	GGAGTAGTGTCTCGGCAGTAAAC CACGAAGGCGAGGAAGAACAT	8	248-278	P	x	x
BhUNICAMP030	(AC) ₂ AT(AC) ₉	237	60	CATCCATCAAATCTCCTATCTG TTCTGCTGTTTCTGCTTCTGTA	7	220-238	P	x	x

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos primers (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP031	(CTCG) ₃	171	62	CATCTGGCTGTGTCGTGTATCC GGTGGCGTGTGAAAATCAAAC	9	166-184	P	x	x
BhUNICAMP032	(AG)AA(AG) ₅	238	62	CGGGTTCGGATGCAGTAAAGTT CGCAGCGCCCTCTCAAGTTC	5	230-250	P	x	x
BhUNICAMP033	(GT) ₉	285	57	ATGATGGTTAGAGATAGTTT ACCCTTTTGTGAGCATA	6	282-304	P	x	x
BhUNICAMP034	(TG) ₃ CA(TG) ₃ ...(GT) ₅	248	60	TGTTAGCAGGATGAGGTAGAA CGTTATCGCTTTGTCTATTGG	2	248-250	P	x	x
BhUNICAMP035	(GT) ₆	218	60	GTCATGCACGTCTTATCTCCTG CACTCCCATTGCCCTGTTT	6	216-234	P	x	x
BhUNICAMP036	(TAG) ₄ (TGG) ₄ TGTT(TG) ₇ (CG) ₄	266	57	ATGCTCATGTGAAAAGAAAGATA TGCACATAAATTTAGATACTGG	7	246-268	P	x	x
BhUNICAMP037	(CA) ₄ CCG(AC) ₃	238	62	GACTGCTCGGTGCTGTGC AGAATAATCCGTTGGGCTCATA	4	224-240	P	x	x
BhUNICAMP038	(GT) ₁₀ TT(GT) ₃	288	62	CGAGTCTGCATCTAGGAAAAAG CTAGACACTGCATTGGAAGTGG	5	270-288	P	x	x
BhUNICAMP039	(ACCA) ₃	256	touch65-55 ^b	TTTGCAATTTCTGGACGGTGAC CTCGGAACGCGCCTACTGG	2	254-256	P	x	
BhUNICAMP040	(GT) ₅	196	55	GTGGCGGGGATAACAAC TGGCTTCTCCTGGACTACAAA	3	196-268	P	x	x
BhUNICAMP041	(GT) ₃ AT(AC) ₅ TC(AC) ₃ TC(AC) ₄ ATTC(AC) ₆	288	50	TTCTAGAGTTAAGGATGGTTG TTTTTAGATTAGATTTGTTTTG	4	266-300	P	x	
BhUNICAMP042	(TC) ₁₃ TATCTA(TC) ₈	250	62	TTCCCATCGACGACTACTTCC GCCAACAGAGCAGCCAAACAT	10	194-310	P	x	x
BhUNICAMP043	(TTTTA) ₄	262	60	TGGTGAATCGAATAAAGAAGTCC CCATGCTACAAAATAAACTCC	2	258-270	P	x	
BhUNICAMP044	(GT) ₄ GC(GT) ₃	262	60	TTTTCCCATTTCTTTCTCCTG TTTTTATGCCTCAACCCTTCAA	8	168-298	P	x	x
BhUNICAMP045	(AC) ₄ AG(AC) ₄	171	touch55-45 ^b	TTACGCATGAAGCACAG AAGAAAGTTTTGATAAGGAT	5	126-190	P	x	x
BhUNICAMP046	(AC) ₉	163	57	CTGACATGCATGGTAGAGGA AAGATGGAAATTAGGGAAGG	2	154-164	P	x	
BhUNICAMP047	(GA) ₃ TT(GA) ₃	294	60	CTTTGAGGGACCGAGACTTTTC AACACCACAACCTCAACGCACAC	3	280-300	P	x	x
BhUNICAMP048	(GA) ₂₃	241	57	AGGAAAAGGAAGTCTGCTGTAA TATTGAGAGGCCGGAAGTGTT	4	220-252	P	x	x
BhUNICAMP049	(AC) ₇	295	60	CACACCATACGCACGAA GCAGCCATTACAGTTTACAGGT	2	292-300	P	x	x
BhUNICAMP050	(AT) ₃ G(GA) ₃	290	55	ACTGGGTCTGGCTGTATCCT CAAAGTAGCCAAGAAAAATGAA	2	294-300	P	x	x
BhUNICAMP051	(TC) ₁₈	301	60	AGCCACCATCTCGTAGTCT GCTTCTCGCATCATTTCTG	3	276-308	P	x	x
BhUNICAMP052	(GGCC) ₃	158	60	TAAACCGACCTTGGGGAAACAT GAGTGACACCGCCCTGAGTAAA	2	152-164	P	x	
BhUNICAMP053	(GT) ₇	199	57	CTGGGCATAGACTGTGTTGTT TCTCTGGAAGGCTATGAATGAT	3	202-216	P	x	

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos primers (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP054	(TC) ₅ ...(TC) ₁₆ (TG) ₁₁	246	60	AAGCTTGGGGTTTTTCCTAC TCTAATTTGCTCATGCTTTCTTG	2	224-238	P	x	x
BhUNICAMP055	(CATG) ₃	200	57	GAGAGTGGGGTGCTATC TAATCTTGAAGTAATGACAG	10	200-242	P	x	x
BhUNICAMP056	(TTTA) ₃	144	60	GAGATCGTCGCACCACTAA ATGCATTGATATTCCTCTGAT	4	126-148	P	x	x
BhUNICAMP057	(TG) ₅ T(TG) ₄ AGGG(TG) ₂	210	touch65-55 ^b	GCGGCGCGGCAAGTCGT TTCGCGCTCGCCAACAGAAC	9	174-259	P	x	x
BhUNICAMP058	(CTT) ₄	181	touch55-45 ^b	CAGTAGAATGTAGTGGATGA CTTAATTTTTGAGAGGAA	2	182-198	P	x	x
BhUNICAMP059	(AG) ₉ TGAGAC(AG) ₇	195	touch55-45 ^b	AAAGAAGAATAGAAAAGAGGAT AAAAGAAATGCCAAACA	8	176-208	P	x	x
BhUNICAMP060	(CA) ₈	249	60	ATTGTCGATGTGCTGGAT GCGAGTAGTGGTAGAAATAGTT	2	248-250	P	x	
BhUNICAMP061	(AC) ₇	206	60	ATAAGCACTCACTACTCTCAGG AGGTTCTAGGTTTAAGGTTGTA	2	202-258	P	x	x
BhUNICAMP062	(AC) ₆	175	60	GAGTATCGTTGCCGTTAGTTC AGTGACATTGGCCTTCTTCT	3	176-218	P	x	
BhUNICAMP063	(GCTC) ₃ ...(GT) ₃ CA(GT) ₆	194	62	CGAACGGCCGTCCTATCCTA GTTCCGGCCCTCTACTTTTTG	10	164-240	P	x	x
BhUNICAMP064	(CAC) ₆ CGTCAT(CAC) ₄	199	62	AAAATAATTCGACCACCACCAA TGACGAAACTGATGATGAGGAG	2	208-210	P	x	x
BhUNICAMP065	(TC) ₃ (TG) ₈	176	55	AAGGGATATTTGTGTTTCT TTTTTCAGGATTGCTAAG	2	144-168	P	x	x
BhUNICAMP066	(GT) ₇	126	60	AGGATTTAAAGGACCCACCAT TCCGCTCGGACTGTGATT	2	-	P	x	x
BhUNICAMP067	(GT) ₇	212	60	GCATATGCAGAGTTTTTGTT TGACCATTTTTCTTATCTTTCT	2	212-216	P	x	
BhUNICAMP068	(AC) ₄ (CA) ₅ CG(CA) ₃ ...(CA) ₅	248	50,5	GATGCATCTCCCTCCCTTACTC AGACATTCATCCCCTTTCACAA	3	-	P	x	x
BhUNICAMP069	(TTG) ₉ (TG) ₆ TT(TG) ₅ CG(TG) ₅	265	60	CGATAGTTAGGCGAGAGTTTTG TATTGTCGATGGCAGAGTTCA	8	-	P	x	x
BhUNICAMP070	(TG) ₈	277	55	CCGTGGAATCCGACAGGTAG CCGGGAGGAGAGTTAGAAGATG	9	234-288	P	x	x
BhUNICAMP071	(TC) ₁₁	191	55	GATGCCAAATAATACGCTAACC GAAGAAAGGGGAGGATACTGAC	10	178-260	P	x	x
BhUNICAMP072	(AG) ₁₃	294	60	TCTCTTAAGCGACCAAGTA CAGGAGATAAGTAAAATGAAT	3	298-310	P	x	x
BhUNICAMP073	(TG) ₇	231	60	CCGCTGAGCTGTATAGGAAGTT AAGAGGCGGGACATTTAGGA	3	224-230	P	x	x
BhUNICAMP074	(GT) ₃ (TG) ₅ GG(TG) ₄	216	60	TGTGTTTGTGTTCTCTATGTGT TATGTGATCCAAAAGTGAAGTG	9	214-230	P	x	x
BhUNICAMP075	(CA) ₁₁	132	60	TAACACAAGTGCAGGGCGTAAT TGAACACAGCGACACAAGACAC	5	102-134	P	x	x
BhUNICAMP076	(AC) ₁₁	245	60	ACACCACACCAAATTTCTTACCC TCTCGTTTCATGGCACTGTCTA	5	238-250	P	x	x

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos <i>primers</i> (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP077	(TG) ₁₀	262	60	ACGCCGACGAGTTGGTG TCAGGACGTGCCGATGGTAAT	7	264-286	P	x	
BhUNICAMP078	(AG) ₂₀	286	56,7	GCACTAAACAAGAAAAGATT TACATGCAGCAACTAAGATA	10	250-340	P	x	x
BhUNICAMP079	(TGCG) ₃	236	60	GTGTGGTTGCAGGACGGATTG TGAGTGCATGACAGGTGACGAA	2	224-236	P	x	
BhUNICAMP080	(TG) ₅	268	60	ATAACACGGCCAGAACTA ATGAACAATCGGGGTAT	9	232-288	P	x	x
BhUNICAMP081	(TG) ₉	230	60	CCATATGTGAAGGCTGCGTGAA GTGGCGGGCTAGTGGCTTATC	3	220-238	P	x	
BhUNICAMP082	(TG) ₅	286	60	TCCCTTGACTCGCATTTTTGAC ACATCGGCGCCAGTTTTCTC	7	274-296	P	x	x
BhUNICAMP083	(AG) ₂₂	219	60	AGCGACCTCCAGCAACCTT TTTCCCACTTTTCCCTCTCAC	6	208-306	P	x	x
BhUNICAMP084	(TC) ₁₈	279	55	CTAAACAGGTAACAGACAAT CAAACGTGAATACATAACA	2	254-280	P		
BhUNICAMP085	(GT) ₁₄	165	60	TGATTCAAAACGCCACGATAGG GGACCGGAACACTGCTTACGA	5	152-170	P	x	x
BhUNICAMP086	(GT) ₇	132	61,8	CATGTGTTGGTGTCTCGTG GCCTCTCAACTGCTGTGG	4	152-172	P	x	x
BhUNICAMP011*	(TA) ₅	193	57	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	1	194	M		
BhUNICAMP013*	(TCA) ₆	205	60	Jungmann et al. (2009) (Capítulo I)	1	208	M		
BhUNICAMP087	(CT) ₁₉	279	touch65-55 ^b	AACTTGACCCTTTTCTACACCTAA AAAAACACCACTGAATCCTACTG	1	-	M		
BhUNICAMP088	(TC) ₃ C(TC) ₂	157	50	TTGAGTATCCATAAAGTGTC GTGAAATAATGTAATAAAATC	1	158	M		
BhUNICAMP089	(TCG) ₄	123	60	GACGTGGTCTCCGATTGAAG TTTACTGACGACGACGCTATGA	1	122	M		
BhUNICAMP090	(AC) ₅	242	50	GTGTACAATATAAATGGAAAAT TTAGAAGAGCGATAGAGAAC	1	250	M		
BhUNICAMP091	(GT) ₄ AT(GT) ₃	136	60	GTTCCGTTCTTTACCTTACC GGCGTGAGTTTTAGATACCT	1	-	M		
BhUNICAMP092	(CA) ₇	184	60	CGCATACACGCAACAGCACA TGAGGTGCTACGTCCAGCAGAG	1	-	M		
BhUNICAMP093	(TG) ₆	257	60	CTCTCCCAGCGTCTTTC TATATCGGTGTAGCATTTC	1	255	M		
BhUNICAMP094	(CA) ₇	214	60	CCGCTACCTGTCCCCTTTTG ACCCGAGCACTCACCTACTTC	1	208	M		
BhUNICAMP095	(CT) ₄ TT(AC) ₈	239	60	GCGGGCCCTTTATTTAT TCGGATGTTGTTGATTTCTTC	1	248	M		
BhUNICAMP096	(TC) ₃ CG(TC) ₃	269	60	GGAAAAGAAGCATGGGAAGAAA GGTAGGGAAGTGAAGGGAATGG	1	268	M		
BhUNICAMP097	(CT) ₃ TT(CT) ₄	131	60	GCCCCGACGTCATTACACA TGACACCACCCTCCCCTTTAT	1	134	M		

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos primers (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP098	(AT) ₃ TGC(AT) ₄	133	60	GGAATATTGTTGCTGAGAGTGG GCGACGACAGAATAAAAAATGAT	1	132	M		
BhUNICAMP099	(AATA) ₃	49.5	55	ATGTCACGTTATCAGCAGAAG GGGCCACATCACCTTTT	1	198	M		
BhUNICAMP100	(TGCA)TAG(TGCA) ₃	202	50	ATTGAATAGGACTAAAGAAAA CTCCCCAGACTGAAGACTA	na	na	na		
BhUNICAMP101	(GT) ₁₀ (AT) ₄	159	57	TAAACTATGTGAATCCAGGTAT CAAGTGCCAAAAGAAAA	na	na	na		
BhUNICAMP102	(GT) ₅	272	50	CCAATGGTAATATGGTTCAGT ACACAGTACAGACGCAGATG	na	na	P		
BhUNICAMP103	(GT) ₆ GA(GT) ₃	251	62	GCCCCAGTTCGATCCCAGTCT AATGCGCGTGTTCGGTGTCT	na	na	P		
BhUNICAMP104	(TG) ₁₃	230	60	AGGGTGGATCATTGAAGAGGTG GTGATATGCGGAAACAGACGAA	na	na	na		
BhUNICAMP105	(AC) ₉	178	60	ATGAAAAATGGACCCAATAAAAA ACACTGTCGACGTCGCATCTAC	na	na	P		
BhUNICAMP106	(CA) ₁₃	185	50	CTTTTATTCTTTTCTTTTAT AGCACCTCCTCTATCTTTT	na	na	P		
BhUNICAMP107	(TGCA) ₃	250	touch55-45 ^b	ACCGGAGCATGTCGATTTGATT AGAACATAGGGTGGCTGAGTGG	na	na	na		
BhUNICAMP108	(CA) ₁₃	285	50	GAAACGATGGTGCCTGAT AATAAATGGAATGAAATGAAAA	na	na	na		
BhUNICAMP109	(CT) ₁₄	132	50	TCTTCTCCTTCACTTTCACAC TACGTCAAGTTCGATCATTCTT	na	na	na		
BhUNICAMP110	(TC) ₁₇	308	60	CTCCAAGCAGTGTAAGAAGT GAGGAAATCCCAAAGTCATC	na	na	na		
BhUNICAMP111	(GT) ₄ GG(GT) ₃	228	56,7	TCTTTGGCTCTGAATGTGCT TTGATGCCGAATGGAACC	na	na	na		
BhUNICAMP112	(AC) ₅	240	55	TCGCTTTGTCATTGGCTTATTG TACCAGGAGGGAGGGAGGATTT	na	na	na		
BhUNICAMP113	(TG) ₉	244	touch55-45 ^b	CATGTAATTTGTTTGTGAGTTT TTTTTGGGTTTGGTTTATG	na	na	na		
BhUNICAMP114	(TG) ₅ GG(TG) ₃	255	60	TGAGGTCTCCGTTCTTGAGGT ACGAGGCTGCCCGAGTAATC	na	na	P		
BhUNICAMP115	(GA) ₂₀	204	50,5	TGTAGTGTGCTGTAGAGTTA CATTGTTTTGAAGATTTG	na	na	na		
BhUNICAMP116	(CA) ₆ ...(CT) ₃ CC(CT) ₄	206	60	TTCACCAAGCTATAAAGGAG TCGAAAATTCAGTATCAAAGTC	na	na	na		
BhUNICAMP117	(TC) ₁₇	227	touch55-45 ^b	TGGTTCCAACAAAATG TCAAAGAGAAGTAAGTCAATG	na	na	na		
BhUNICAMP118	(TC) ₁₈	254	60	CCTCCCCTTCTCCCTCCATA CGGCCTTCGTACCATCAGACAC	na	na	na		
BhUNICAMP119	(GT) ₅	249	61,8	TGTTAGTGGGGCCTTAGTCATTG GGAGTGCGGCCATCATTTT	na	na	na		
BhUNICAMP120	(TC) ₉	265	touch55-45 ^b	CATCGGGTGGTTTGGTG CCTGGTTAGCGGTGGACA	na	na	na		

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos primers (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP121	(TC) ₉ ...(TC) ₁₀	231	55	CATACTTGCATTCTTTTGAT TGTATGAATTTATTGTTGACT	na	na	na		
BhUNICAMP122	(CTTG) ₃	257	60	TGTAAGCATATCATTTCGTCTA ACTGCCCTGTTTTCTG	na	na	na		
BhUNICAMP123	(CGG) ₄	234	touch55-45 ^b	CGCAGGGCAGCATCGTTC CTCATCAGCGGTTGGGTCATCT	na	na	na		
BhUNICAMP124	(GA) ₁₉ ...(AT) ₅	228	55	CTGTTGACCAAGAAGGAC AAACGTGTTAGGAAAGTATG	na	na	na		
BhUNICAMP125	(TG) ₁₁	293	55	ATGGAGCTGTATATGGTGGTGA TTCTCTGCTAACGCTGGACTAA	na	na	na		
BhUNICAMP126	(TC) ₂₀	284	56,7	TACATGCAGCAACTAAGATA GCACTAACAGAAAAGATT	na	na	na		
BhUNICAMP127	(AG) ₃ A(AG) ₄	285	60	GGGCCCGGCACAACAGTAG AGGCCACACGCAGAGAACA	na	na	na		
BhUNICAMP128	(AC) ₁₇ GC(AC) ₆ AT(AG) ₇	294	60	TAGCAATGCATGGATAAGACT TGGAGCTCACCTAAGAAG	na	na	na		
BhUNICAMP129	(AC) ₅	182	55	CAAGAGAACTGCGTATCAT TTAAAGCCAAAATCAGGT	na	na	na		
BhUNICAMP130	(CA) ₅	199	45	AAAAAGGAAAAGATGACA TTACGCAAATAGAAAAA	na	na	na		
BhUNICAMP131	(CA) ₁₂ CG(CA) ₉	291	60	GAGTAAGCTTCTAGGACAGGAT GCTCAAACAACCTCGATAATAAC	na	na	na		
BhUNICAMP132	(TC) ₇	261	60	GGAAAAGAAAAGCGGACTGAA ACGCAAAATAAATGGCAATGGA	na	na	P		
BhUNICAMP133	(TGTT) ₄	239	60	GCCACAACAGCAAATC ATGTATGAGGACCCAAGTTATG	na	na	na		
BhUNICAMP134	(TC) ₁₁ CC(TC) ₆	232	55	CTCTTGCTGCATGATTTCTTGA CGGGAGGGGAGCATTATTA	na	na	na		
BhUNICAMP135	(TC) ₁₉	211	touch65-55 ^b	CTCTCCCTCTCACTCATCACCA GAGCGACATCCAGCACTTTT	na	na	na		
BhUNICAMP136	(ATGT) ₃	290	55	CAATCCATTTTAAACAAGAAGTC GCAACAGTCCGTAGTAAGTATC	na	na	na		
BhUNICAMP137	(AG) ₁₆	191	touch65-55 ^b	GACTGCAGCTCGTTTCCTCAT TTGTTTTATAGCAGCCACCTC	na	na	na		
BhUNICAMP138	(AT) ₆	159	touch65-55 ^b	TGACGCTTAAATGGCAATCTAC TTCTATCACCTCGGCTTACAT	na	na	na		
BhUNICAMP139	(TTTTG) ₃	279	55	AATCCAAAAGTCATCCCCAAT TTTTTCGGCAACAGACAGGTAA	na	na	P		
BhUNICAMP140	(AC) ₇	178	touch65-55 ^b	TAAGTGTAGGATAATGGTCA TAAGCTAGGTTCTGGTTG	na	na	na		
BhUNICAMP141	(CA) ₈	155	touch65-55 ^b	CAAACCTCGTGCTCGTG AGATGGGTTGGGCTGTC	na	na	na		
BhUNICAMP142	(AG) ₁₇	195	touch65-55 ^b	CTCGAATATGCTGGAGAG	na	na	na		

ATGAGGATAGATGATTAGG

Tabela 1. continuação

Loco microsatélite	Motivo	Tamanho esperado do produto	Ta (°C) ^a	Sequências dos <i>primers</i> (5' - 3')	Características para o mapa genético em <i>B. humidicola</i>				
					Nº de bandas	Varição do tamanho (pb)	Polimorfismo na população de mapeamento	Uso no mapa	Ligado
BhUNICAMP143	(AT) ₅	280	56,7	TAGCTGGGATGAAAAACAAAA GTGGGAATACAAATGACAGTG	na	na	na		
BhUNICAMP144	(GA) ₈ G(GA) ₁₄	199	60	CAAGAAAGCGCGATGAAAA GAACACAATGGAGAAGCAGGTC	na	na	na		
BhUNICAMP145	(TC) ₁₉	175	60	CCCCTACTTTTATACGACACAT GAACGAGAGTAGTAGCATTGGT	na	na	na		
BhUNICAMP146	(TG) ₂ T(TG) ₆	264	56,7	CCTATACTGGCGGTCAT TGTTTTCCAGTTATTTG	na	na	na		
BhUNICAMP147	(GT) ₈ ...(TGA) ₄	257	touch65-55 ^b	GGAGTGGAGCCAAGATGTGAA TGTAATGGTTGCAGCGAAAAT	na	na	na		
BhUNICAMP148	(CGG) ₄	279	touch65-55 ^b	ACCGCGAGCCAACCCACAC GCGGCGGCGAGGAAGAGGAGTC	na	na	na		
BhUNICAMP149	(GGAG) ₄	173	touch55-45 ^b	TGCACTCTTACAGGTCTCAGGA CTAGGGGTCATTTCTTTGGTG	na	na	na		
BhUNICAMP150	(GT) ₁₃	173	touch55-45 ^b	ATAAGGGTCGCTGCAATAGTGT CAAGTGGGTCATCATCTCTGTG	na	na	na		
BhUNICAMP151	(CT) ₁₃ (CA) ₇	130	touch55-45 ^b	TATATGGTGGTTTTGTTGA TCCATGGTTTGATTTGA	na	na	na		
BhUNICAMP152	(TCTT) ₃	218	55	ATGACAACTGACCGTATC TAGCAATTTCTTTATCAACT	na	na	P		
BhUNICAMP153	(CT) ₁₇ ...(CT) ₅	301	60	ACCCCTGTAATTGTTGTCC GATTCAGATGGTTAGCGTGTTA	na	na	P		
BhUNICAMP154	(CA) ₃ CC(CA) ₄	290	55	GGATTAATTGCCTTCTGTGATA CATTGATGATACTGGTGGACTC	na	na	na		

* SSR previamente publicado por Jungmann et al. (2009) (Capítulo I). Nesta tabela estão listados somente os SSR publicados que foram utilizados no mapeamento.

na: não avaliado

-: não disponível

^a: temperatura de amplificação

^b: programa de PCR touchdown (Don et al. 1991), onde 65-55 ou 55-45 são as faixas de temperatura utilizadas

Tabela 2. Resumo dos marcadores microssatélite

	SSR	Marcas totais	Marcas ligadas no mapa
Número de marcadores desenvolvidos*	154	-	-
Número de marcadores avaliados na população	94	-	-
Número de marcadores monomórficos entre os genitores	15	-	-
Número de marcadores polimórficos entre os genitores	79	374	-
Marcadores em dose simples (1:1)	-	147	114
	tipo D1 (ao x oo)	66	49
	tipo D2 (oo x ao)	81	65
Marcadores em dose dupla-simples (3:1)	(tipo C - ao x ao)	17	10
Total (1:1 e 3:1)	63	164	124
Número de marcadores com distorção na segregação	16	210	250

*incluindo os já publicados (Jungmann et al. 2010)

al., 2009). Ao todo, os marcadores que não segregaram de acordo com o esperado para marcas em dose única correspondem à 56,1% do total avaliado para segregação. Do total de 164 marcas, 124 foram agrupadas para compor os grupos de ligação para a espécie em estudo, enquanto que as 40 marcas restantes permaneceram não ligadas (Tabela 2).

Cross-type

As marcas foram classificadas em três tipos (D1, D2 e C) de acordo com o genótipo dos genitores e tipo de segregação esperada na população de mapeamento (Wu *et al.*, 2002). O número de marcas com a configuração “oo x ao” (tipo D2) foi a mais frequente (55,1%), marcas em dose simples vindas do genitor masculino, e 44,9% das marcas que segregavam de acordo com o esperado apresentavam a configuração “ao x oo” (tipo D1), marcas em dose simples vindas do genitor feminino. A configuração “ao x ao” (marca heterozigota em ambos os genitores, tipo C) contribuiu com apenas 4,8% do número total de marcas ligadas (Tabela 2). É importante ressaltar que as marcas do tipo C permitem a integração dos mapas dos genitores, ou seja, permite avanços com relação a abordagem de pseudo-testcross.

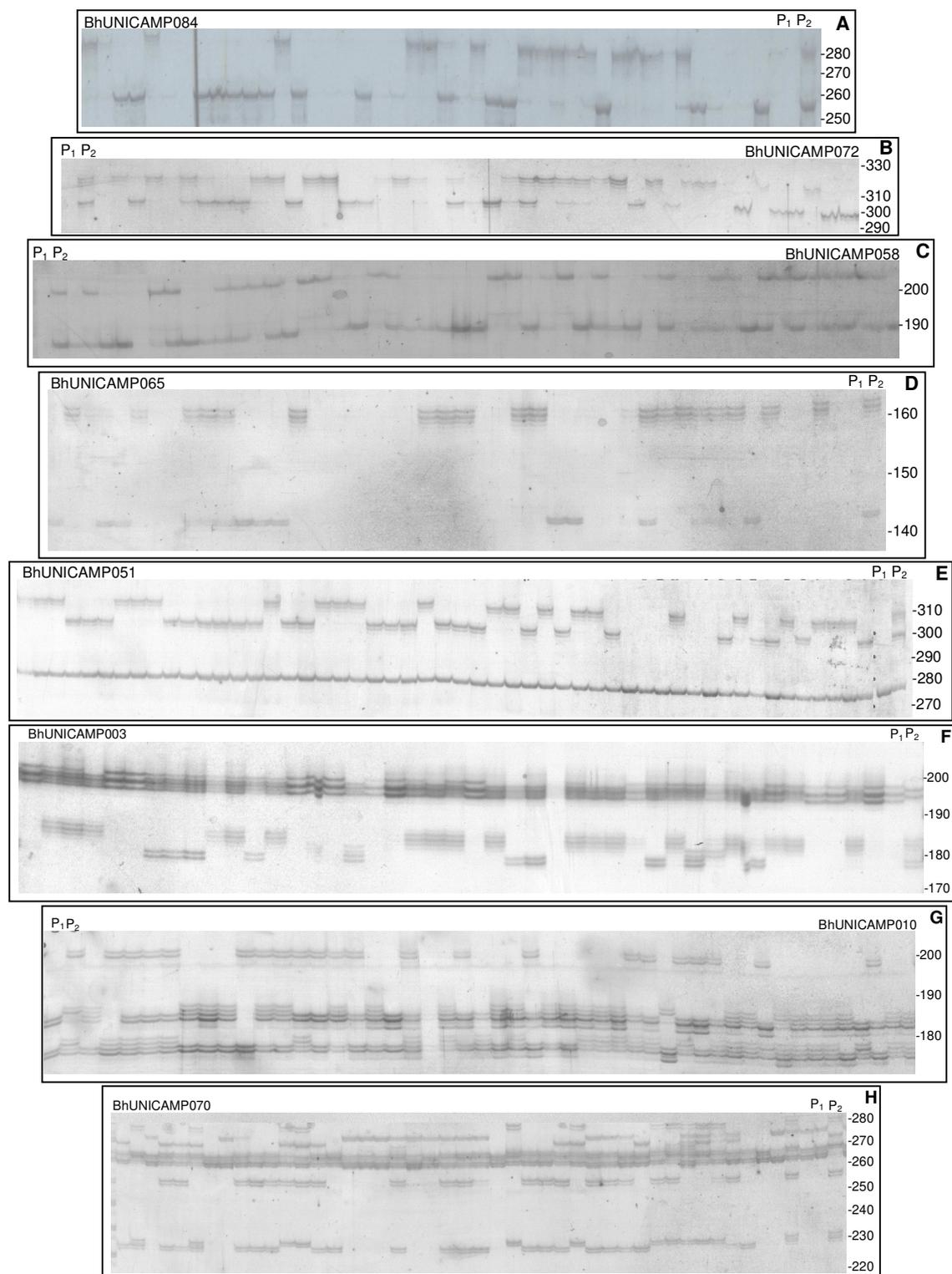


Figura 1. Perfil alélico dos genitores da população de mapeamento (indicados como P₁ (H031, materno) e P₂ (cv. BRS Tupi, paterno)), juntamente com alguns híbridos, para os locos BhUNICAMP084 (A),

BhUNICAMP072 (B), BhUNICAMP058 (C), BhUNICAMP065 (D), BhUNICAMP051 (E), BhUNICAMP003 (F), BhUNICAMP010 (G) e BhUNICAMP070 (H). A ausência de amplificação no P₁ (H031) está representada em (A), (B), (C) e (D), com exemplos de locos com herança dissômica. A amplificação de duas regiões genômicas diferentes está indicada em (E), (F), (G) e (H), onde uma região genômica apresenta mais alelos que a outra do mesmo loco, além de uma herança polissômica do loco. Os tamanhos dos fragmentos estão indicados à direita das figuras em pb (pares de bases).

Mapa de ligação

O mapa de ligação foi obtido através do Software OneMap, com base na metodologia desenvolvida por Wu *et al.* (2002) e expandida posteriormente para abordagem multiponto. De todas as marcas que segregam de acordo com o esperado (164), 124 foram mapeadas em 38 grupos de ligação (LG, do inglês *Linkage Group*) com LOD = 5. Inicialmente foram encontrados 36 LGs, porém, durante a ordenação dos marcadores dentro do LG7, observou-se que algumas marcas poderiam não estar ligadas, tratando-se possivelmente de falsos positivos, que ocorrem comumente em análises de ligação. Dessa forma, decidiu-se por dividir o LG7 em três LGs distintos (Figura 2), formando os LG7, LG8 e LG9, totalizando 38 grupos de ligação.

Os LGs foram nomeados de “LGx”, onde “x” é o número do LG, seguido de sua identificação de acordo com o tipo de marca presente no LG. Se o LG apresenta somente marcas do tipo D1 ou D2, ele foi classificado como LGx_D1 ou LGx_D2, respectivamente. Se o LG apresenta também marcas do tipo C, ele foi classificado e nomeado como LGx_I, ou seja, integrado, pois as marcas do tipo C são heterozigotas para ambos os genitores, o que permitiu estabelecer as relações de ligação entre marcadores D1 e D2 que segregam para apenas um dos genitores (Figura 3).

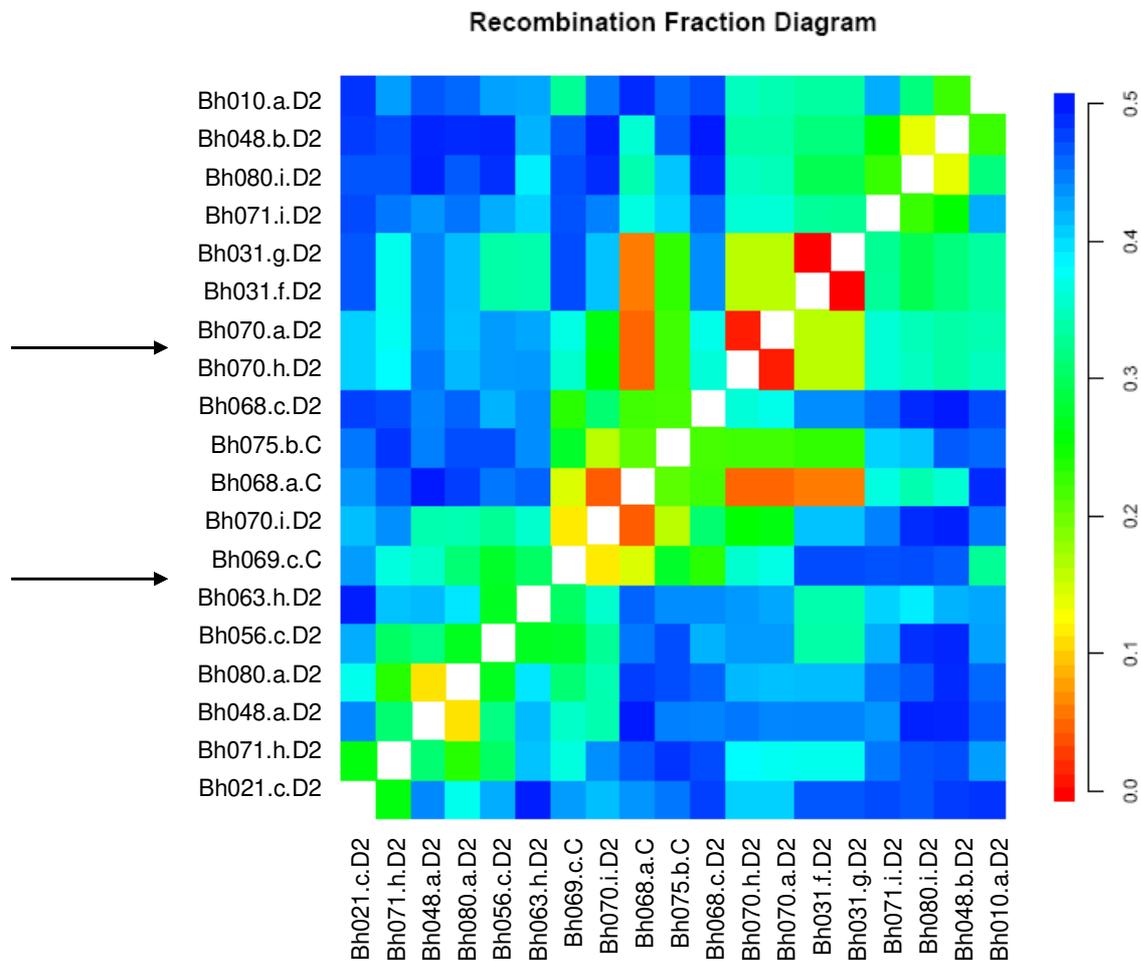


Figura 2. Diagrama das frações de recombinação entre cada par de marcadores do LG7. A barra lateral à direita indica as frações de recombinação de acordo com a cor no diagrama. As setas horizontais à esquerda indicam os dois pontos onde o LG foi quebrado, gerando então três LGs (LG7, LG8 e LG9)

Dezenove LGs (50%) foram formados com apenas duas marcas ligadas; sete LGs com três marcas; sete LGs com quatro marcas; um LG com cinco marcas; um LG com seis marcas; um LG com sete marcas; um LG com nove marcas e um LG com 11 marcas, apresentando em média 4,3 marcas por LG. Os LGs apresentam tamanhos diversos, variando entre 2,3cM e 163,4cM, com média de 40,6cM por LG. O mapa cobriu 1.543,8cM, com uma

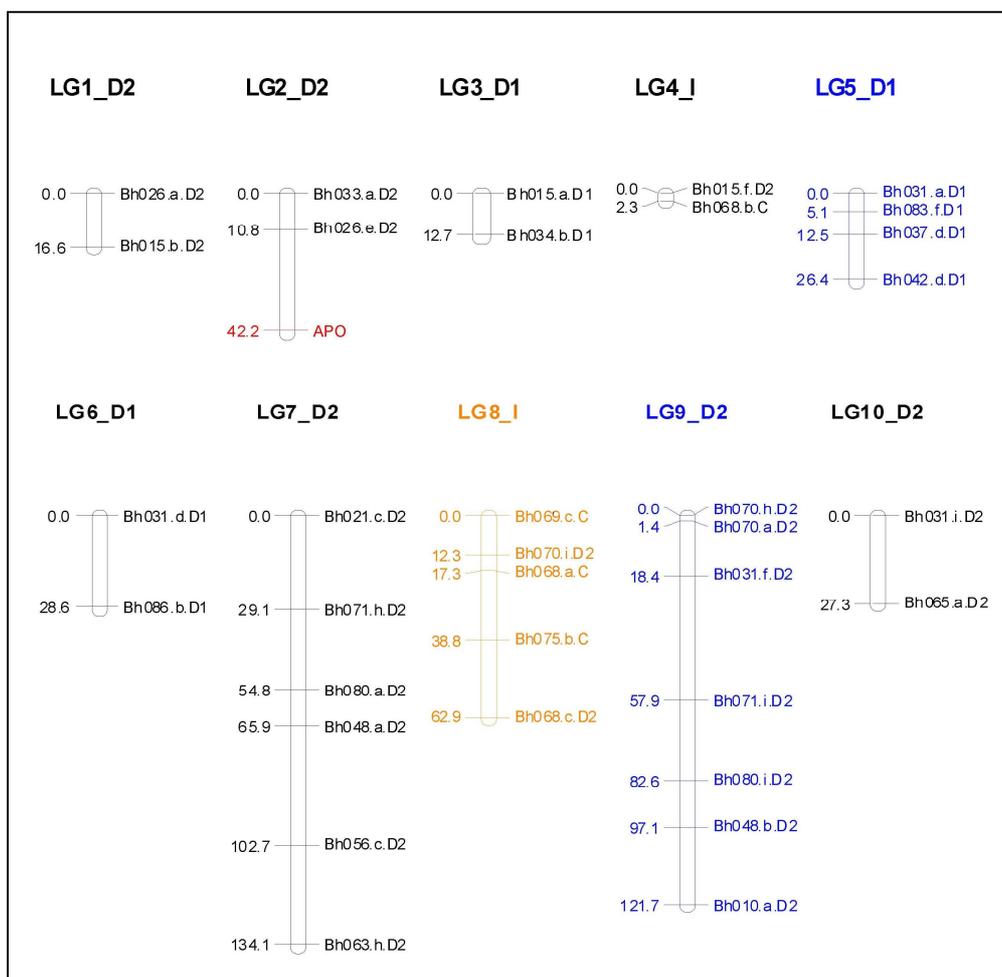
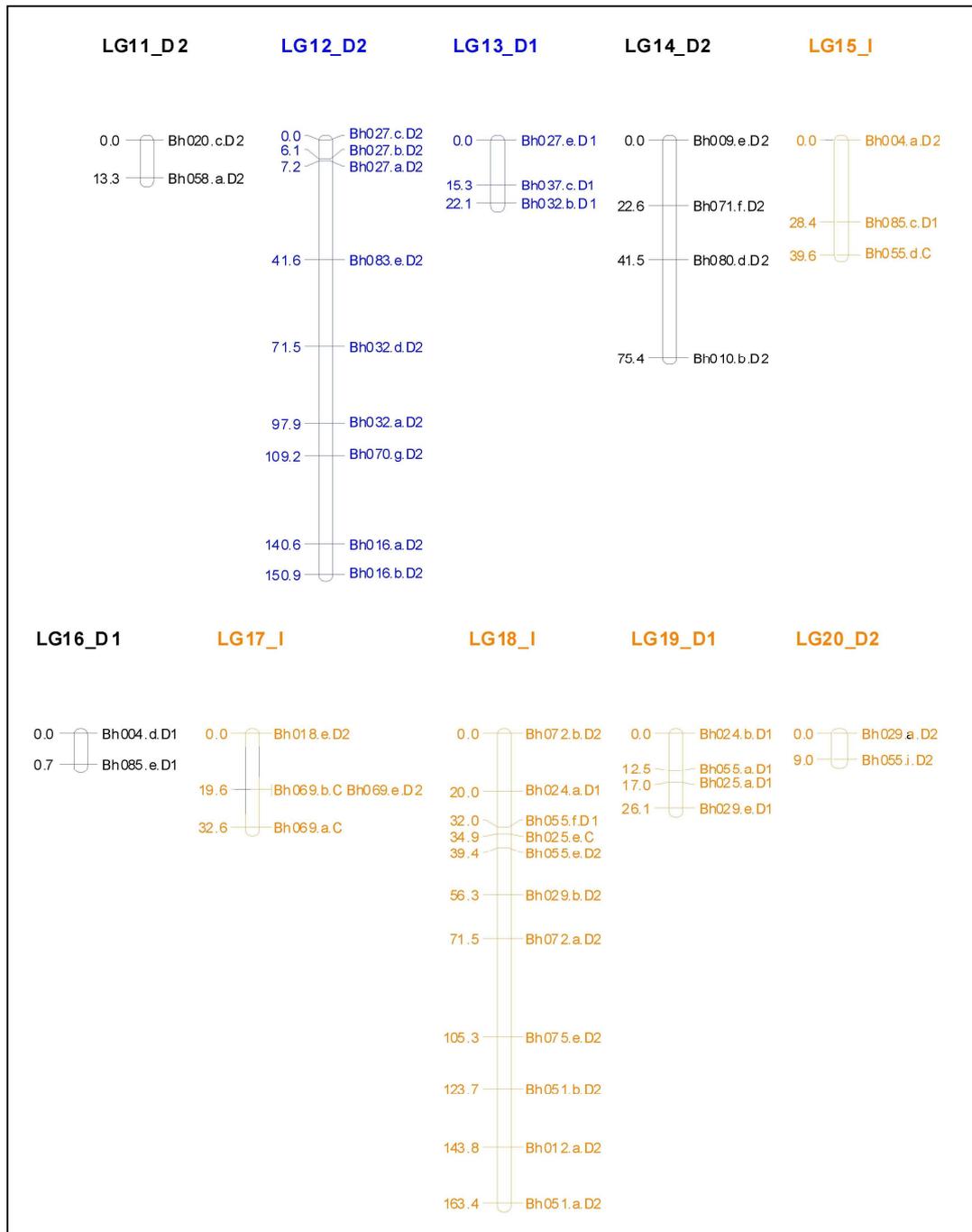


Figura 3. Mapa genético do cruzamento H031 (sexual) x cv. BRS Tupi (apomítico) baseado em 279 indivíduos F_1 . Os grupos de ligação (LGs) estão numerados seqüencialmente e identificados com uma letra, que indica o tipo de LG (I: integrado, D1: só com marcas D1, D2: só com marcas D2). As distâncias são dadas em centi-Morgans (Kosambi) e estão indicadas do lado esquerdo. As marcas estão identificadas de acordo com o descrito no Material e Métodos e localizadas à direita dos LGs. O GH I está indicado em azul e o GH II em laranja. Os LGs em preto não se agruparam. O loco da aposporia (APO) está indicado em vermelho.

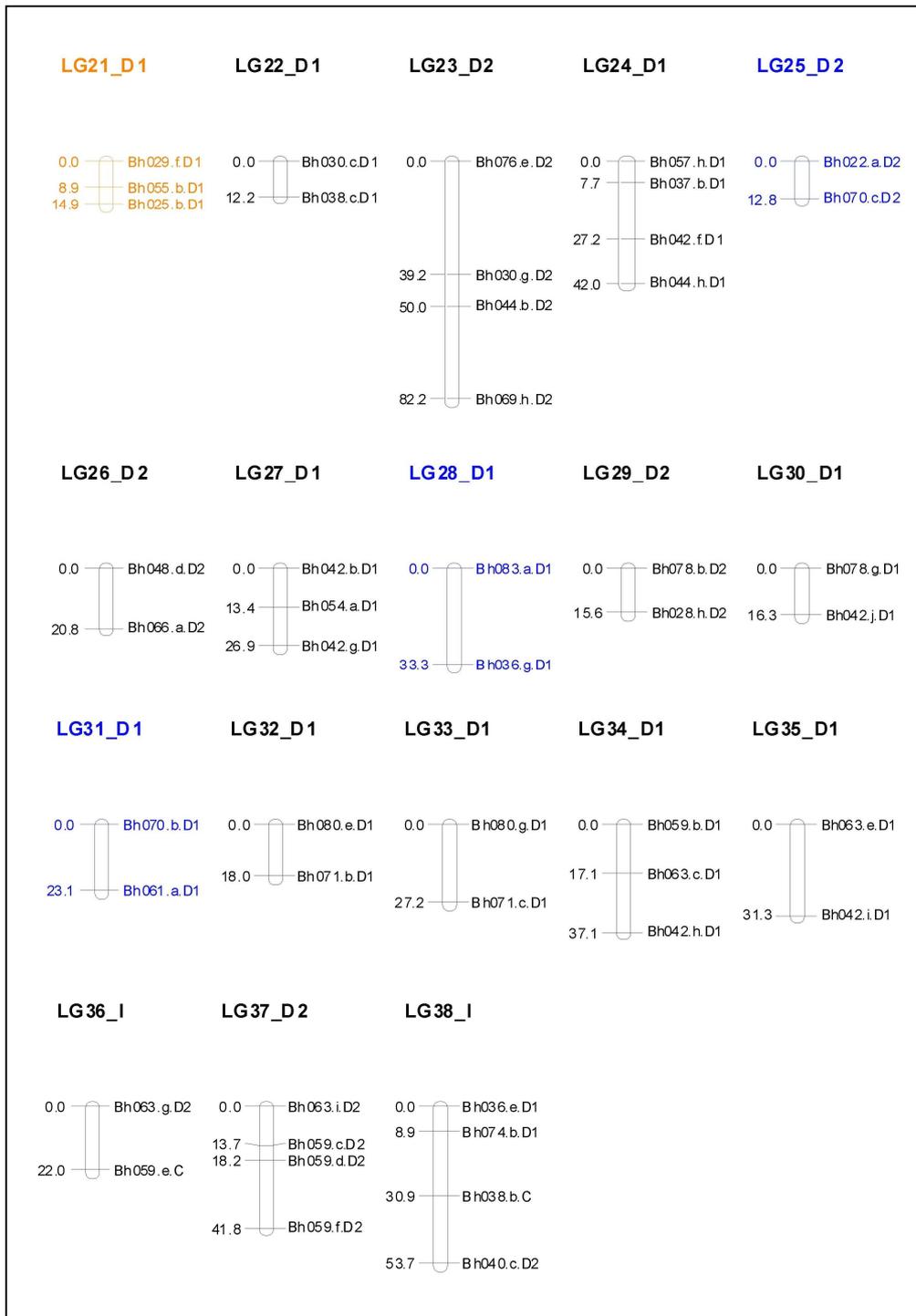
distância média entre marcas (densidade) de 12,3cM. Algumas marcas apresentaram-se em clusters em alguns LGs, enquanto outras foram distribuídas esparsamente, com intervalos de até 39,5cM (LG9). Das 17 marcas do tipo C, dez foram mapeadas em sete LGs diferentes.

Figura 3. continuação



Foram encontrados três LGs com marcas do tipo C-D1-D2 juntas e quatro LGs com marcas do tipo C e D2 juntas, e nenhum LG apresentou marcas do tipo C e D1 juntas.

Figura 3. continuação



Grupos de homologia

Os grupos de homologia (GH) foram agrupados com base em dois métodos apresentados na literatura, embora sem claras justificativas (Porceddu & Albertini *et al.*, 2002; Lerceteau-Kohler *et al.*, 2003). Inicialmente, utilizando marcas de um mesmo loco ligadas em diferentes LGs, a partir do qual foi obtido apenas um GH com 37 LGs, restando apenas o LG11 não agrupado. Tal resultado não parece consistente com as características da espécie. O outro método utilizado baseia-se em marcas ligadas em repulsão, sendo possível agrupar os GL em grupos de homologia (GH). Foram encontrados dois GHs, cada um com sete LGs (Figura 3), e 24 LGs permaneceram independentes.

Mapeamento da aposporia

A aposporia apresentou segregação 1:1 a partir da análise de Qui-quadrado, o que está de acordo com o esperado teoricamente. O apo-loco apresentou-se ligado ao LG2, a 31,4cM da marca Bh026.e.D2 e 42,2cM da marca Bh033.a.D2. Este grupo de ligação apresentou somente marcas D2, ou seja, marcas com alelos exclusivos do genitor apomítico, o que faz sentido do ponto de vista biológico.

Discussão

Foram utilizados marcadores microssatélites para o desenvolvimento de um mapa genético-molecular inédito para *Brachiaria humidicola*, através de uma população de mapeamento derivada de um cruzamento entre a única planta sexual da espécie disponível e uma cultivar (cv. BRS Tupi). Os marcadores foram desenvolvidos a partir de biblioteca

enriquecida previamente construída (Jungmann *et al.*, 2009b, Capítulo I) e representam um conjunto significativo de ferramentas importantes para o programa de melhoramento da espécie, podendo auxiliar estudos acerca da biologia da espécie e de espécies próximas.

A análise de ligação com marcadores em dose simples foi adotada com sucesso no mapeamento de poliplóides alógamos (*outcrossing*), quando linhagens endogâmicas não podem ser facilmente obtidas para gerar retrocruzamentos ou progênies de mapeamento F_2 (Maliepaard *et al.*, 1997; Hoarau *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2010). Segundo Wu *et al.* (1992), uma progênie de 75 indivíduos é suficiente para detectar locos em dose simples e segregando na população em questão. Nossas marcas em dose simples foram detectadas em uma progênie com 279 indivíduos.

O mapa foi gerado através da metodologia proposta por Wu *et al.* (2002) expandida para análises multiponto, e apresenta 124 marcas distribuídas em 38 grupos de ligação, com uma cobertura de 1.543,8cM do genoma. O mapa não está saturado, dada a grande quantidade de grupos de ligação com apenas duas marcas e da existência de 40 marcas não ligadas (24%) ao mapa. Além disso, a não utilização de marcas em doses múltiplas (duplex em um dos genitores e triplex ou multiplex de dosagens maiores) no mapeamento de organismos poliplóides faz com que grande parte dos dados gerados seja descartada, dificultando a obtenção de mapas saturados.

Seria esperado encontrar 36 LGs nesta espécie, entretanto, a identificação de 38 LGs pode ser decorrência de uma pequena amostragem do genoma, resultando em LGs separados que não se ligam por falta de um ou mais marcadores que consigam estabelecer relações de ligação entre dois LGs. A identificação de mais LGs do que o esperado também pode ocorrer devido à utilização exclusiva de marcas em dose única para o mapeamento genético.

Ainda que menos informativas, as marcas do tipo C permitem o estabelecimento de relações entre marcas originadas em cada genitor (marcas D1 e D2),

possibilitando a construção de um mapa genético integrado (Garcia *et al.*, 2006). Ligações entre marcas D1 (originárias do genitor H031) e marcas D2 (originárias do genitor cv. BRS Tupi) através de marcas do tipo C foram observadas somente em sete LGs, sendo eles: LG4, LG8, LG15, LG17, LG18, LG36, LG38. Destes, os LGs 15, 18 e 38 apresentaram marcas do tipo C, D1 e D2 ligadas, o que representa um número significativo de LGs integrados, já que para cana-de-açúcar, também uma gramínea poliplóide, Oliveira *et al.* (2007) encontraram apenas um LG integrando os três tipos de marcadores. Dentre os demais LGs, 17 apresentaram somente marcas do tipo D1 e 14 apresentaram somente marcas do tipo D2.

Um estudo do cariótipo de acessos de *B. humidicola* revelou que a espécie possui cromossomos com comprimento entre 1,85 e 3,78 μ m no acesso hexaplóide (Bernini & Marin-Morales, 2001). Quando comparados aos cromossomos de trigo (entre 8,4 e 13,8 μ m) (Gill *et al.*, 1991) e de *Bromus riparius* (entre 5,5 e 6,8 μ m) (Tuna *et al.*, 2001), ambas gramíneas, podemos observar que *B. humidicola* apresenta cromossomos pequenos. Para outras espécies, foi observada uma alta correlação entre o tamanho físico do cromossomo e o número de marcadores por cromossomo (Castiglioni *et al.*, 1999; Tanksley *et al.*, 1992). Dessa forma, o resultado encontrado no mapa de ligação, com LGs com tamanho médio de 40,6cM, corroboram os estudos citogenéticos, mas deve ser confirmado com uma maior saturação do mapa genético.

A identificação de GHs a partir de marcas de um mesmo SSR não foi satisfatório, revelando apenas um GH com 37 LGs. Dessa forma, adotamos a metodologia utilizada por Porceddu & Albertini *et al.* (2002), com base em marcas ligadas em repulsão; foram neste caso encontrados dois GHs, cada um com sete LGs, número próximo do esperado, pois $x=6$. Os outros 24 LGs não foram agrupados, devido a ausência de ligações em repulsão entre esses LGs e aqueles agrupados.

O poder de detecção de ligação em repulsão em poliplóides depende do tamanho da população de mapeamento, do nível de ploidia e do comportamento dos

cromossomos no pareamento da meiose (Porceddu & Albertini *et al.*, 2002). Wu *et al.* (1992) constataram que quando os cromossomos se pareiam randomicamente (autopoliploidia), o poder de detecção das fases de ligação em repulsão é pequeno. Dessa forma, podemos assumir que em *B. humidicola* os cromossomos se pareiam randomicamente, já que foram detectadas poucas ligações em repulsão (ver Tabela Suplementar 1), estando a maioria em acoplamento. Para a maioria dos LGs, um número significativo de marcas em repulsão não foi identificado, mas não se pode excluir a possibilidade de que alguns LGs são muito pequenos para se enquadrar em um GH. A ligação em repulsão é importante no agrupamento de LGs em GHs (Porceddu & Albertini *et al.*, 2002).

O tipo de poliploidia apresentado pela espécie *B. humidicola* permanece ainda não bem definido, pois evidências de hibridização natural foram descritas por Boldrini *et al.* (2009a; b; 2010). Existem também evidências de aloploidia no gênero *Brachiaria* (Mendes-Bonato *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2006; Nielen *et al.*, 2010). Além disso, as informações a respeito da estrutura e organização do genoma ainda são escassas. Dessa forma, dificuldades no mapeamento são esperadas para populações como esta.

A distinção entre os tipos de poliploidia nem sempre é simples, sendo necessária a combinação de dados citogenéticos, morfológicos e genéticos, além de informações sobre a fertilidade, para determinar se um poliplóide é autopoliplóide, aloploplóide segmental, aloploplóide verdadeiro ou autoalopoliplóide (Grant, 1981; Tate *et al.*, 2005). A análise do comportamento meiótico de 45 híbridos desta população de mapeamento revela que os pareamentos cromossômicos durante a meiose são em sua maioria bivalentes (de 6 a 18 bivalentes, sendo sempre o pareamento preferencial), mas também são encontrados uni-, tri-, tetra- e hexavalentes (dados não mostrados). Ao observarmos o perfil de amplificação dos SSR utilizados neste estudo, verificamos que mais da metade (54%) dos locos amplifica duas regiões diferentes, indicando dois genomas diferentes, o que já tinha sido observado no estudo da diversidade genética do germoplasma (Jungmann & Vigna *et al.*, 2010, Capítulo II). Além

disso, observamos locos com herança dissômica, característica de alopoliplóides, enquanto que outros locos apresentam herança polissômica, característica de autopoliplóides. Segundo Stebbins (1950) e Grant (1981), a observação da ocorrência tanto de bi- como multivalentes na meiose e de alguns locos com herança dissômica e outros, polissômica, são evidências da ocorrência de autoalopoliploidia. Com base nessas observações, podemos sugerir que indivíduos hexaplóides de *B. humidicola* apresentam origem autoalopoliplóide.

Esta hipótese corrobora estudos citogenéticos e moleculares que relatam a ocorrência de gametas não-reduzidos e hibridização em gramíneas, inclusive do gênero *Brachiaria* (Risso-Pascotto *et al.*, 2003; Utsonomiya *et al.*, 2005; Adamowski *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2007; Boldrini *et al.*, 2009a; b; 2010). Além disso, foram observados cromossomos retardatários na anáfase I e II de alguns híbridos de *B. humidicola*, o que indica a presença de dois genomas com tempo de migração diferentes, resultado de uma possível hibridização (dados não mostrados).

A hipótese de autoalopoliploidia explicaria em parte a dificuldade em agrupar os LGs em GHs, já que o conjunto de cromossomos seria formado tanto por cromossomos homólogos como homeólogos. Além disso, a utilização exclusiva de MDUs também seria um fator limitante para a detecção de GHs. Os critérios usados portanto para classificar os Ghs precisam ser revistos para tais espécies.

As evidências citogenéticas e moleculares obtidas neste trabalho, juntamente com dados da literatura, sugerem que os indivíduos hexaplóides de *B. humidicola* podem ter sido formados a partir do cruzamento entre dois progenitores diplóides ($2n=2x=12$), um contribuindo com um gameta reduzido ($n=6$) e o outro com um gameta não-reduzido ($n=12$), formando um indivíduo triplóide ($2n=3x=18$), o qual sofreu uma duplicação, originando um indivíduo autoalohexaplóide ($2n=6x=36$). Outra possibilidade seria um cruzamento entre um progenitor tetraplóide ($2n=4x=24$) e um diplóide ($2n=2x=12$), formando o mesmo tipo de

indivíduo triplóide e a mesma via de formação do hexaplóide do caso acima. Pode ter acontecido uma das duas vias de formação do triplóide, ou as duas vias concomitantemente.

As observações do perfil de amplificação dos microssatélites também sugerem a possível existência de duas cópias de um genoma e uma cópia de um segundo genoma

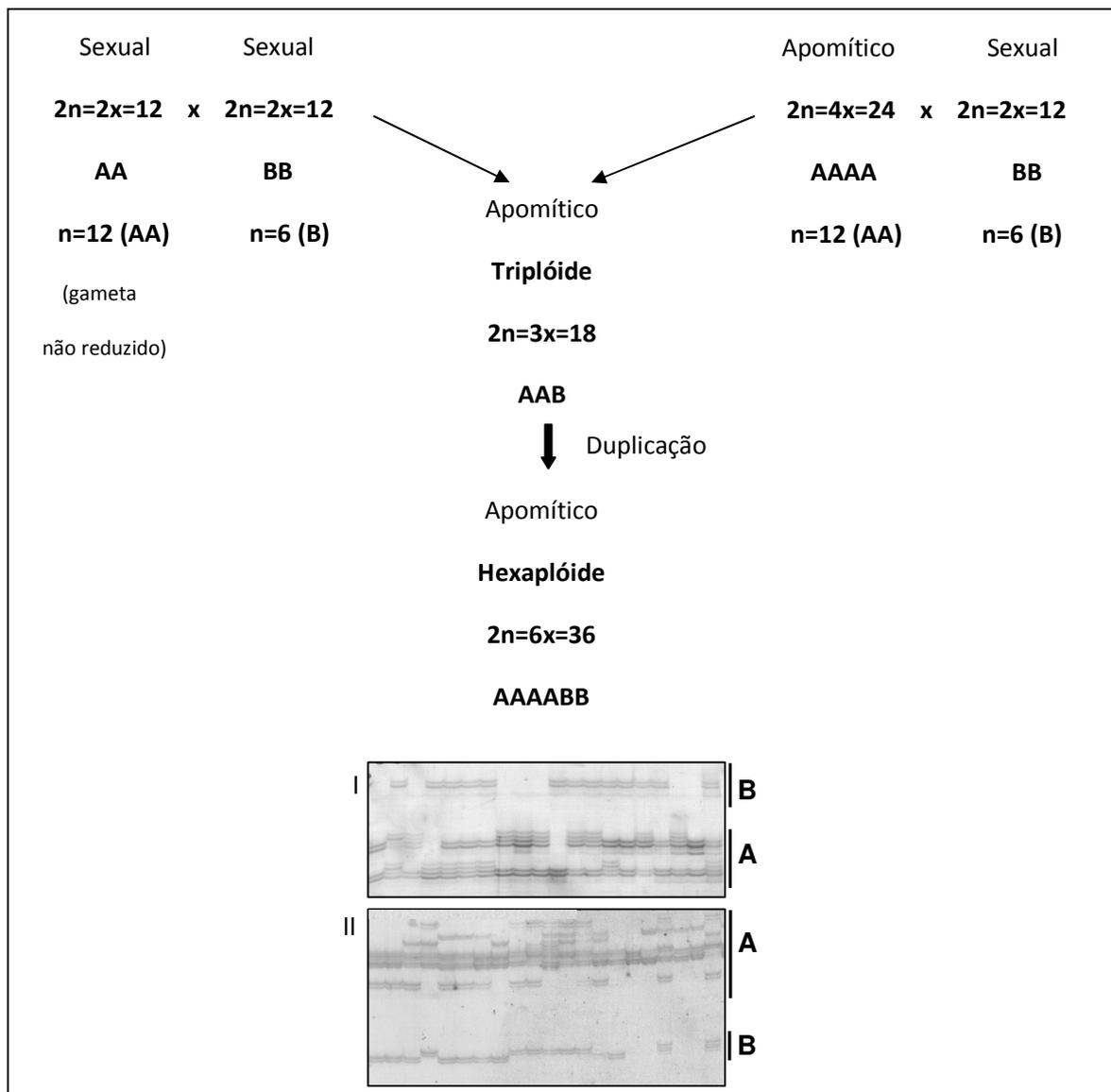


Figura 4. Esquema ilustrativo da origem dos genótipos hexaplóides de *Brachiaria humidicola*, com base em dados citogenéticos e moleculares. Os dois genomas diferentes são indicados por A e B. As figuras representam o perfil de amplificação de dois locos microssatélite (BhUNICAMP010 em I e BhUNICAMP070 em II) e a correspondência das regiões de amplificação aos genomas A e B.

diferente, já que em muitos dos casos onde ocorre a amplificação de duas regiões do genoma nos locos, uma região possui mais marcas do que a outra. Dessa forma, o modelo acima ficaria mais completo como ilustrado na Figura 4.

Os resultados encontrados para a fenotipagem do modo de reprodução corroboram a hipótese de que um único gene dominante controla a apospória do tipo apospórica (Valle & Savidan, 1996). A apospória foi mapeada somente em um LG, o LG02, assim como o obtido para *Paspalum notatum* (Stein *et al.*, 2007) e para *Brachiaria* sp. (Pessino *et al.*, 1998), o que corrobora estudos sobre a característica em outras gramíneas, que revelam uma região genômica associada à apospória (ASGR), que não sofre recombinação (Akiyama *et al.*, 2005; Ozias-Akins *et al.*, 2003). É necessária a utilização de mais marcadores para a saturação da região ligada à apospória e sugerimos a utilização de marcadores funcionais ligados a genes relacionados à característica, como TRAP e EST-SSR. Ademais, temos perspectivas de incorporar ao nosso mapa de ligação a marca RAPD associada à apospória descrita por Zorzatto *et al.* (2010).

Ao analisarmos os conjuntos alélicos dos genitores do cruzamento na Figura 1 em Jungmann & Vigna *et al.* (2010 – Capítulo II), podemos observar que o genitor cv. BRS Tupi (indivíduo 60 na Figura 3 do Capítulo II) apresenta um conjunto alélico dominante (vermelho) o qual é muito pouco representado no genitor H031 (indivíduo 30 na Figura 3 do Capítulo II). O genoma deste último apresentou-se formado por diferentes conjuntos alélicos, cada um deles um pouco representados no genitor cv. BRS Tupi. Ainda que bem distantes geneticamente (Figura 6, Capítulo II), os genitores puderam se cruzar e obter descendentes férteis por apresentar essa parcela do genoma em comum. O desenvolvimento dos locos microssatélites utilizados neste estudo foi feito a partir do genitor cv. BRS Tupi, nos fazendo acreditar que pode ter havido um mapeamento preferencial do conjunto alélico vermelho, ainda que não haja predominância de marcas D2 (configuração oo x ao, presentes somente no genitor cv. BRS Tupi) no mapa de ligação. Além disso, a ausência de amplificação de alguns locos no genitor

H031 e a formação de muitos LGs com poucas marcas e alguns LGs com muitas marcas também são evidências desse mapeamento preferencial. Para verificarmos essa hipótese, propomos a construção de uma biblioteca enriquecida a partir do genitor H031 e o desenvolvimento de novos SSR para saturação do mapa.

A saturação do mapa com estes novos SSR e com os já desenvolvidos poderá elucidar algumas das hipóteses aqui apresentadas. A utilização de marcadores do tipo SNP também pode trazer grandes contribuições ao mapa genético, dada sua co-dominância, mesmo em poliplóides, e a possibilidade de utilizar múltiplas doses. Estudos complementares de citogenética, como hibridização *in situ*, permitiriam o estudo da evolução do genoma da espécie. Os genitores do cruzamento são segregantes para o hábito de crescimento, intensidade de perfilhamento, largura de folha, e produtividade, além do modo de reprodução, permitindo estudos futuros de QTLs ligados a estas características para a espécie.

O mapa de ligação gerado neste estudo traz informações importantes acerca do genoma e da genética da aposporia para a espécie, podendo ser usado como base para estudos básicos e aplicados em *Brachiaria*. Além disso, representa um primeiro passo para a obtenção de um mapa genético saturado e para a clonagem de genes ligados à aposporia, tão importantes para o melhoramento genético de espécies apomíticas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios à pesquisa concedidos (2005/51010-0 e 482458/2007-0, respectivamente), pelas bolsas de IC (2007/51467-5), MS (2007/57022-5) e DD (2010/50032-8) concedidas a BBZV e bolsa de IC (2009/53787-2) concedida a GCA pela FAPESP e Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida pelo CNPq a APS (307430/2007-3) e a AAFG (308139/2007-0).

Referências Bibliográficas

- Adamowski E de V, Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007) Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*. 6(3): 616-621.
- Aitken KS, Jackson PA, McIntyre CL. (2007) Construction of a genetic linkage map of *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. *Genome*. 50: 742-756.
- Akiyama Y, Hanna WW, Ozias-Akins P. (2005) High-resolution physical mapping reveals that the apospory-specific genomic region (ASGR) in *Cenchrus ciliaris* is located on a heterochromatic and hemizygous region of a single chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*. 111: 1042-1051.
- Al-Janabi SM, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1993) A Genetic Linkage Map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics*. 134: 1249-1260.
- Bethel CM, Sciara EB, Estill JC, Bowers JE, Hanna W, Paterson AH. (2006) A framework map of bermudagrass (*Cynodon dactylon* x *transvaalensis*) based on single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 727-737.
- Bernini C & Marin-Morales A. (2001) Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. *Cytobios*. 104: 157-171.
- Bitencourt GA, Valle CB do, Chiari L, Salgado LR. (2007) Análise do modo de reprodução e determinação de híbridos por RAPD em *Brachiaria humidicola*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia. Anais. Ribeirão Preto: SBG, 2007
- Bitencourt GA, Chiari L, Valle CB, Salgado LR, Leguizamón GOC. (2008) Uso de marcadores RAPD na identificação de híbridos de *Brachiaria humidicola*. *Boletim de Pesquisa*, 23. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. 19p
- Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006a) Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics*. 85(3): 225-228.
- Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006b) Cell fusion and cytomixis during microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *South African Journal of Botany*. 72(3): 478-481.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB (2009a) Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses $x = 6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research*. 8 (3): 1444-1450.

Boldrini KR, Micheletti PL, Gallo PH, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB (2009b) Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*. 8(3): 888-895.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do. (2010) Evidence of natural hybridization in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Journal of Genetics*. 89(1): 91-94.

Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, van Wijk R, Motto M. (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 425–431.

Cervantes-Flores JC, Yencho GC, Kriegner A, Pecota KV, Faulk MA, Mwangi ROM, Sosinski BR (2008) Development of a genetic linkage map and identification of homologous linkage groups in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding*. 21:511–532.

Chiari L, Bitencourt G de A, Salgado LR, Valle CB, Leguizamón GOC. (2007) Identificação precoce de híbridos de *Brachiaria humidicola* por marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRA, Campo Grande, MS. Anais... Campo Grande: EMBRAPA CNPQC, 2007. p.1-3.

Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, et al. (2008) Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant physiology*. 147(3): 1396-411.

Da Silva JAG, Sorrells ME, Burnquist WL, Tanksley SD (1993) RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36:782–791.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 19:14.

Doyle JJ & Doyle JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*. 19: 11–15.

- Dusi DMA & Williamse MTM. (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 41: 151-162.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M, Nakayima K. (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Science*. 51: 71– 78.
- Gallo PH, Micheletti PL, Boldrini KR, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007) 2n Gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae:Paniceae). *Euphytica*. 154: 255–260.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza NA, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A, Souza AP. (2006) Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 298–314.
- Gill BS, Friebe B, Endo TR. (1991) Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*. 34: 830-839.
- Goel S, Chen Z, Akiyama Y, Conner JÁ, Basu M, Gualtieri G, Hanna WW, Ozias-Atkins P. (2006) Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics*. 173: 389-400.
- Grant V (1981) *Plant Speciation*. 2nd edition. New York: Columbia University Press.
- Gualtieri G, Conner JÁ, Morishige DT, Moore LD, Mullet JE, Ozias-Akins P. (2006) A segment of the apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and buffelgrass, but also with a Rice chromosome 11 centromeric-proximal genomic region. *Plant Physiology*. 140: 963-971.
- Hoarau JY, Grivet L, Offmann B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glaszmann JC, Grivet L. (2001) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 84–97.
- Huo H, Conner JA, Ozias-Akins P (2009) Genetic mapping of the apospory-specific genomic region in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 119(2): 199-212. doi: 10.1007/s00122-009-1029-y

- Jessup RW, Burson BL, Burrow G, Wang YW, Chang C, Li Z, Paterson AH, Hussey MA. (2003) Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L) as revealed by genome mapping. *Genome*. 46: 304–313.
- Jungmann L, Vigna BBZ, Paiva J, Sousa ACB, Valle CB, Laborda PR, Zucchi MI, Souza AP. (2009) Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Conservation Genetics Resources*. 1: 475–479. doi: 10.1007/s12686-009-9111-y
- Jungmann L, Vigna BBZ, Boldrini KR, Sousa ACB, Valle CB, Resende RMS, Pagliarini MS, Zucchi MI, Souza AP. (2010) Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. *Genome*. 53: 698–709.
- Keller-Grein G, Maass BL, Hanson J. (1996) Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 16-42.
- Kosambi DD. (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eug.* 12: 172–175.
- Lerceteau-Köhler E, Guérin G, Laigret F, Denoyes-Rothan B. (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 619-628.
- Lutts S, Ndikumana J, Louant BP. (1994) Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F₁ hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *B. ruziziensis*. *Euphytica*. 57: 267-274.
- Maliepaard C, Jansen J, Van-Ooijen JW. (1997) Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genetics Research*. 70: 237-250.
- Margarido GRA, Souza AP, Garcia AAF. (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*. 144: 78-79.
- Mendes DV, Boldrini KR, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle, CB do. (2006) Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 150: 441–446.

Mendes-Bonato AB, Filho RGJ, Pagliarini MS, Valle CB, Penteado MIO. (2002) Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology International*. 26: 641–646.

Miles JW & Escandon ML. (1997). Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. *Canadian Journal of Plant Science*. 77: 105–107.

Mollinari M, Silva RR, Margarido GRA, Oliveira KM, Marconi TG, Souza AP, Garcia AAF. (2009) Development of an integrated genetic linkage map of sugarcane (*Saccharum* spp.) incorporating double and triple dose markers. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, 2009. ISBN 978-85-89109-06-2.

Morrone O & Zuloaga FO. (1992) Revisión de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Darwiniana*. 31(1–4): 43–109.

Nielen S, Almeida LM, Carneiro VTC, Araujo ACG. (2010) Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. *Sexual Plant Reproduction*. 23: 45–51.

Nogler GA. (1984) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus-Auricomus*. 5. Conclusion. *Botanica Helvetica*. 94(2):. 411-422.

Okada M, Lanzatella C, Saha MC, Bouton J, Wu R, Tobias CM. (2010) Complete switchgrass genetic maps reveal subgenome collinearity, preferential pairing and multilocus interactions. *Genetics*. 185: 745–760.

Oliveira KM, Pinto LR, Marconi TG, Margarido GRA, Pastina MM, Teixeira LHM, Figueira AV, Ulian EC, Garcia AAF, Souza AP. (2007) Functional integrated genetic linkage map based on ESTmarkers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. *Mol Breeding*. 20: 189-208.

Ozias-Akins P, Akiyama Y, Hanna WW. (2003) Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Functional and Integrative Genomics*. 3: 94-104.

Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW. (1998) Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus which may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 5127-5132.

Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB, Hayward MD. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas*. 128: 153–58.

Pessino SC, Ortiz J, Leblanc O, do Valle CB, Hayward MD. (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*. 94:439–44.

Porceddu A, Albertini E, Barcaccia E, Falistocco E, Falcinelli M. (2002) Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 273–280.

Ripol MI, Churchill GA, Da Silva JAG, Sorrells M. (1999) Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene*. 235: 31–41.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB, Mendes-Bonato AB. (2003) Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding*. 122: 136-140.

Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K, Hopkins AA. (2005) An SSR and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theoretical and Applied Genetics*. 110(2): 323–336.

Savidan YH. (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*. 18: 13-86.

Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA. (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding*. 20:153–166.

Stebbins GL. (1950) *Variation and Evolution in Plants*. New York: Columbia University Press.

Tanskley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND. (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 132:1141–1160.

Tate JA, Soltis DE & Soltis PS. Polyploidy in Plants. *In*: Gregory TR (Ed.) *The Evolution of the Genome*. Elsevier, 2005. p. 371-426.

Tuna M, Gill KS, Vogel KP. (2001) Karyotype and C-Banding Patterns of Mitotic Chromosomes in Diploid Bromegrass (*Bromus riparius* Rehm). *Crop Science*. 41: 831–834.

Utsunomiya KS, Pagliarini MS, do Valle CB do. (2005) Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf. (Gramineae). *Biocell*. 29: 295-301.

Valle CB do & Savidan YH. (1996) Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, Colombia. pp. 147-163.

Valle CB do, Bitencourt, G. A. ; Chiari L, Resende RMS, Jank L, Arce AQ. (2008) Identification of the mode of reproduction in *Brachiaria humidicola* hybrids. In: International Congress on Sexual Plant Reproduction, 20, 2008, Brasília. Documentos, 259. Brasília: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 197-197.

Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 294–300.

Wu R, Ma CX, Painter I, Zeng ZB. (2002) Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*. 61: 349-363.

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. (1979) Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*. 57: 1668-1672.

Zorzatto C, Chiari L, Bitencourt GA, Valle CB, Leguizamón GOC, Schuster I, Pagliarini MS. (2010) Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Plant Breeding*. doi:10.1111/j.1439-0523.2010.01763.x

Tabela Suplementar S1. Diagrama da fase de ligação de cada marca nos genitores 1 e 2 da população de mapeamento, em cada LG. A configuração ao x ao indica uma marca do tipo C, ao x oo indica uma marca do tipo D1 e oo x ao indica uma marca do tipo D2. As ligações em repulsão estão indicadas em vermelho.

LG1				LG8			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh026.a.D2	0	o o	a o	Bh069.c.C	0	a o	a o
Bh015.b.D2	16.58	o o	a o	Bh070.i.D2	12.32	o o	a o
log-likelihood:	-314.2973			Bh068.a.C	17.31	a o	a o
				Bh075.b.C	38.78	a o	a o
				Bh068.c.D2	62.88	o o	a o
				log-likelihood:	-617.3739		
LG2				LG9			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh033.a.D2	0	o o	a o	Bh070.h.D2	0	o o	a o
Bh026.e.D2	10.84	o o	a o	Bh070.a.D2	1.44	o o	a o
APO	42.16	o o	a o	Bh031.f.D2	18.39	o o	a o
log-likelihood:	-438.8345			Bh071.i.D2	57.91	o o	a o
				Bh080.i.D2	82.61	o o	a o
				Bh048.b.D2	97.07	o o	a o
				Bh010.a.D2	121.65	o o	a o
				log-likelihood:	-910.3234		
LG3				LG10			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh015.a.D1	0	a o	o o	Bh031.i.D2	0	o o	a o
Bh034.b.D1	12.72	a o	o o	Bh065.a.D2	27.34	o o	a o
log-likelihood:	-296.0028			log-likelihood:	-346.6303		
LG4				LG11			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh015.f.D2	0	o o	a o	Bh020.c.D2	0	o o	a o
Bh068.b.C	2.3	o a	a o	Bh058.a.D2	13.3	o o	a o
log-likelihood:	-243.4011			log-likelihood:	-300.3982		
LG5				LG12			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh031.a.D1	0	a o	o o	Bh027.c.D2	0	o o	a o
Bh083.f.D1	5.15	a o	o o	Bh027.b.D2	6.15	o o	a o
Bh037.d.D1	12.53	a o	o o	Bh027.a.D2	7.23	o o	a o
Bh042.d.D1	26.41	a o	o o	Bh083.e.D2	41.59	o o	a o
log-likelihood:	-431.0581			Bh032.d.D2	71.46	o o	a o
				Bh032.a.D2	97.93	o o	a o
				Bh070.g.D2	109.2	o o	a o
				Bh016.a.D2	140.64	o o	a o
				Bh016.b.D2	150.94	o o	o a
				log-likelihood:	-1085.227		
LG6				LG7			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh031.d.D1	0	a o	o o	Bh021.c.D2	0	o o	a o
Bh086.b.D1	28.57	a o	o o	Bh071.h.D2	29.05	o o	a o
log-likelihood:	-349.7602			Bh080.a.D2	54.8	o o	a o
				Bh048.a.D2	65.94	o o	a o
				Bh056.c.D2	102.74	o o	a o
				Bh063.h.D2	134.13	o o	a o
				log-likelihood:	-882.6227		

Tabela Suplementar S1. continuação

LG13				LG19			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh027.e.D1	0	a o	o o	Bh024.b.D1	0	a o	o o
Bh037.c.D1	15.26	a o	o o	Bh055.a.D1	12.5	a o	o o
Bh032.b.D1	22.15	a o	o o	Bh025.a.D1	17	a o	o o
log-likelihood:	-374.4686			Bh029.e.D1	26.09	a o	o o
				log-likelihood:	-424.9937		
LG14				LG20			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh009.e.D2	0	o o	a o	Bh029.a.D2	0	o o	a o
Bh071.f.D2	22.63	o o	a o	Bh055.i.D2	8.98	o o	a o
Bh080.d.D2	41.52	o o	a o	log-likelihood:	-269.6396		
Bh010.b.D2	75.43	o o	a o				
log-likelihood:	-630.2963			LG21			
LG15				LG21			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh004.a.D2	0	o o	a o	Bh029.f.D1	0	a o	o o
Bh085.c.D1	28.44	a o	o o	Bh055.b.D1	8.95	a o	o o
Bh055.d.C	39.63	a o	a o	Bh025.b.D1	14.86	a o	o o
log-likelihood:	-499.1025			log-likelihood:	-332.1112		
LG16				LG22			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh004.d.D1	0	a o	o o	Bh030.c.D1	0	a o	o o
Bh085.e.D1	10.67	a o	o o	Bh038.c.D1	12.17	a o	o o
log-likelihood:	-286.1482			log-likelihood:	-280.8453		
LG17				LG23			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh018.e.D2	0	o o	a o	Bh076.e.D2	0	o o	a o
Bh069.b.C	19.61	a o	a o	Bh030.g.D2	39.23	o o	a o
Bh069.e.D2	19.62	o o	a o	Bh044.b.D2	50.03	o o	a o
Bh069.a.C	32.62	o a	o a	Bh069.h.D2	82.18	o o	a o
log-likelihood:	-549.7792			log-likelihood:	-621.3604		
LG18				LG24			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh072.b.D2	0	o o	a o	Bh057.h.D1	0	a o	o o
Bh024.a.D1	19.99	a o	o o	Bh037.b.D1	7.66	a o	o o
Bh055.f.D1	31.96	a o	o o	Bh042.f.D1	27.16	a o	o o
Bh025.e.C	34.91	a o	o a	Bh044.h.D1	42.04	a o	o o
Bh055.e.D2	39.4	o o	o a	log-likelihood:	-516.2002		
Bh029.b.D2	56.31	o o	o a				
Bh072.a.D2	71.47	o o	o a	LG25			
Bh075.e.D2	105.32	o o	o a	LG25			
Bh051.b.D2	123.71	o o	o a	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh012.a.D2	143.75	o o	o a	Bh022.a.D2	0	o o	a o
Bh051.a.D2	163.44	o o	a o	Bh070.c.D2	12.82	o o	a o
log-likelihood:	-1459.522			log-likelihood:	-286.6932		

Tabela Suplementar S1. continuação

LG26				LG33			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh048.d.D2	0	o o	a o	Bh080.g.D1	0	a o	o o
Bh066.a.D2	20.78	o o	a o	Bh071.c.D1	27.22	a o	o o
log-likelihood:	-306.592			log-likelihood:	-341.7242		
LG27				LG34			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh042.b.D1	0	a o	o o	Bh059.b.D1	0	a o	o o
Bh054.a.D1	13.43	a o	o o	Bh063.c.D1	17.09	a o	o o
Bh042.g.D1	26.86	a o	o o	Bh042.h.D1	37.08	a o	o o
log-likelihood:	-396.22			log-likelihood:	-442.4938		
LG28				LG35			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh083.a.D1	0	a o	o o	Bh063.e.D1	0	a o	o o
Bh036.g.D1	33.26	a o	o o	Bh042.i.D1	31.29	a o	o o
log-likelihood:	-323.9606			log-likelihood:	-348.7265		
LG29				LG36			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh078.b.D2	0	o o	a o	Bh063.g.D2	0	o o	a o
Bh028.h.D2	15.59	o o	a o	Bh059.e.C	21.97	o a	a o
log-likelihood:	-297.3844			log-likelihood:	-307.5502		
LG30				LG37			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh078.g.D1	0	a o	o o	Bh063.i.D2	0	o o	a o
Bh042.j.D1	16.28	a o	o o	Bh059.c.D2	13.66	o o	a o
log-likelihood:	-309.5787			Bh059.d.D2	18.15	o o	a o
				Bh059.f.D2	41.79	o o	a o
				log-likelihood:	-483.0891		
LG31				LG38			
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2	Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2
Bh070.b.D1	0	a o	o o	Bh036.e.D1	0	a o	o o
Bh061.a.D1	23.07	a o	o o	Bh074.b.D1	8.93	a o	o o
log-likelihood:	-333.6177			Bh038.b.C	30.91	a o	a o
				Bh040.c.D2	53.69	o o	a o
				log-likelihood:	-551.0795		
LG32							
Marcas	Posição (cM)	Genitor 1	Genitor 2				
Bh080.e.D1	0	a o	o o				
Bh071.b.D1	18.04	a o	o o				
log-likelihood:	-315.1894						

RESUMO DOS RESULTADOS

Aqui está apresentado um resumo dos resultados neste estudo em *Brachiaria humidicola*:

Para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites:

- 1) Foram desenvolvidos 154 marcadores microssatélites específicos para *B. humidicola*, os quais foram eficientes na avaliação da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma da espécie, bem como no mapeamento genético.

Para a análise da diversidade do banco de germoplasma:

- 1) Os acessos do banco de germoplasma da espécie apresentaram-se bastante diferentes, agrupando-se em quatro grandes grupos.

- 2) Embora tenha sido observada uma grande diversidade genética nestes acessos, grande parte desta diversidade não pode ser utilizada, devido aos diferentes níveis de ploidia dos acessos e à existência de apenas um acesso sexual.

- 3) O único acesso sexual da coleção apresentou um perfil alélico totalmente diferente dos demais acessos, ficando separado dos quatro grandes grupos identificados no germoplasma. Foi possível identificar cinco marcas exclusivas deste acesso, bem como 276 marcas ausentes no mesmo.

- 4) Não houve correlação significativa entre a diversidade genética molecular (a partir de SSR) e a diversidade genética baseada em 24 caracteres morfológicos.

5) Não houve correlação significativa entre a diversidade genética molecular (a partir de SSR) e as distâncias geográficas a partir dos dados do local de coleta dos acessos.

6) Foi possível sugerir alguns acessos apomíticos para cruzamento com o acesso sexual, de acordo com o nível de ploidia, e a constituição de conjuntos alélicos de cada indivíduo.

Para a construção de um mapa genético e mapeamento da aposporia:

- 1) Dos 154 microssatélites desenvolvidos, 94 foram avaliados na população de mapeamento, com 279 híbridos, dentre os quais 79 foram polimórficos, amplificando 374 marcas. Desse total, 43% (164 marcas) apresentaram segregação de acordo com o esperado para marcas em dose única (1:1 ou 3:1).
- 2) Dentre as 164 marcas, 122 foram mapeadas em 38 grupos de ligação (LG), com uma cobertura de 1.543,8cM do genoma hexaplóide ($2n=6x=36$) da espécie, com um espaçamento médio de 12,3cM.
- 3) Foram identificados dois grupos de homologia, ambos com 7 LGs, ficando os demais LGs não-agrupados
- 4) Foi possível constatar que a progênie segrega para marcas em dose múltipla, sendo que, futuramente, a sua exploração irá garantir um mapa mais saturado, cobrindo uma maior parte do genoma da espécie
- 5) O modo de reprodução por aposporia foi mapeado em um único grupo de ligação, de acordo com o esperado, por provavelmente estar associada à uma região genômica específica associada à aposporia (ASGR).
- 6) Com base no perfil de amplificação dos locos microssatélite e em dados sobre o comportamento meiótico de 45 desses híbridos, podemos sugerir que os genótipos

hexaplóides desta espécie tenham origem autoalopoliplóide, corroborando alguns estudos citogenéticos e moleculares para a espécie.

CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia empregada na construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites [(CT)₈ e (GT)₈] foi eficiente, sendo possível isolar locos de microssatélites específicos polimórficos para *Brachiaria humidicola*. Estes marcadores formam um conjunto de ferramentas moleculares disponíveis para estudos sobre a espécie, bem como seu uso direto no programa de melhoramento.

Estes locos foram eficazes na avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de *B. humidicola*, revelando uma grande diversidade genética entre os acessos e uma estruturação genética entre eles. O único acesso sexual do banco de germoplasma, um hexaplóide natural, apresentou-se muito diferente dos acessos apomíticos. Além disso, a diversidade encontrada no germoplasma não corresponde à diversidade dos locais de origem, onde foram coletados os acessos, não estando organizada espacialmente no centro de origem. A diversidade genética também não apresenta correlação com os diferentes números cromossômicos encontrados dentro desta espécie, revelando a complexidade em se estudar organismos poliplóides e apomíticos.

A construção do primeiro mapa de ligação para a espécie, a partir de locos microssatélites, proporcionou um melhor conhecimento sobre a estrutura do genoma hexaplóide de *B. humidicola*, bem como permitiu inferir sobre sua provável origem autoalopoliplóide. Os métodos estatísticos utilizados apresentam limitações na análise dos locos na população de mapeamento, devido à natureza poliplóide da espécie, mas permitiram a realização do estudo. O loco da apomixia do tipo apospórica foi mapeado em apenas um grupo de ligação do mapa, como era esperado para uma característica dominante e monogênica como a aposporia.

PERSPECTIVAS

Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho servirão como ferramentas moleculares no programa de melhoramento de *Brachiaria humidicola*, podendo ser usados na identificação de híbridos, caracterização de cultivares, seleção de genitores para cruzamentos, avaliação do fluxo gênico e verificação da taxa de cruzamento da espécie.

A avaliação do banco de germoplasma permite a recomendação de acessos apomíticos hexaplóides com conjuntos alélicos diferentes do acesso sexual para a realização de novos cruzamentos dentro do programa de melhoramento. Além disso, este estudo permite a recomendação de acessos para a montagem de uma coleção nuclear, se necessário.

A principal perspectiva para o mapa de ligação é a obtenção de uma maior cobertura do genoma, tanto com os SSR já desenvolvidos e ainda não utilizados, como com novos marcadores, sejam eles SSR ou SNP, estes mais informativos para poliplóides. Um mapa mais saturado permitirá a identificação de um marcador mais próximo do loco da aposporia, possibilitando seu uso no programa de melhoramento e também a clonagem posicional deste gene. Além disso, permitirá o mapeamento de QTLs ligados ao hábito de crescimento, à intensidade de perfilhamento, à largura de folha e à produtividade, características também segregantes na progênie de irmãos completos utilizada no mapeamento.

Por fim, o desenvolvimento de métodos estatísticos adequados para a incorporação de marcas multidoses no mapa de ligação permitirão uma maior saturação do mapa e maior cobertura do genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Adamowski EV, Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2007) Abnormal cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*. 6(3): 616-621.

Adamowski E de V, Pagliarini MS, Valle CB do (2008) Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics*. 87(1): 33-38.

Akiyama Y, Hanna WW, Ozias-Akins P. (2005) High-resolution physical mapping reveals that the apospory-specific genomic region (ASGR) in *Cenchrus ciliaris* is located on a heterochromatic and hemizygous region of a single chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*. 111:1042-1051.

Alcantara PB, Bufarah G. *Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas*. São Paulo: Nobel, 1992. 162p.

Alwala S, Kimberg CA, Veremis JC, Gravois KA. (2008) Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. *Euphytica*. 164:37-51.

Ambiel AC, Guaberto LM, Vanderlei TM, Neto NBM. (2008) RAPD grouping of accesses and cultivars of three *Brachiaria* species. *Acta Scientiarum-Agronomy*. 30(4): 457-464.

Araújo ACG, Nóbrega JM, Pozzobon MT, Carneiro VTC. (2005) Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica*. 144:39-50.

Araújo SAC, Deminicis BB, Campos PRSS (2008) Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. *Archivos de Zootecnia*. 5: 61-76.

Asker S & Jerling L. (1992) Apomixis in plants. Boca Raton: CRC Press.

Assis GML (2001) Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 76p.

Assis GML de, Euclides RP, Cruz CD, Valle CB do (2003) Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. Revista Brasileira de Zootecnia. 32 (3): 576-584.

Ball AD, Stapley J, Dawson DA, Birkhead TR, Burke T, SlateBall J. (2010) A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra fish (*Taeniopygia guttata*). BMC Genomics. 11:218.

Barcellos AO. (2008) Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteínas, nos trópicos brasileiros. Revista Brasileira de Zootecnia. 37: 51-67.

Bhat V, Dwivedi KK, Khurana JP, Sopory SK. (2005) Apomixis: an enigma with potential applications. Current Science. 89(11): 1879-1893.

Billotte N, Lagoda PJJ, Risterucci AM, Baurens FC. (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits. 54: 277-288.

Bitencourt GA, Chiari L, Valle CB do, Leguizamón GOC. (2007) Uso de marcadores RAPD na identificação de híbridos e análise citoembriológica do modo de reprodução em *Brachiaria humidicola*. Campo Grande: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da região do Pantanal, 19p. (Curso de graduação em Ciências Biológicas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Blakeslee H & Avery AG. (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity*. 28:393-411.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2006a) Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics*. 85(3): 225-228.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2006b) Cell fusion and cytomixis during microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *South African Journal of Botany*. 72(3): 478-481.

Boldrini KR, Micheletti PL, Gallo PH, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do (2009a) Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) *Genetics and Molecular Research*. 8(3): 888-895.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2009b) Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses $x = 6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research*. 8(3): 1444-1450.

Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB (2010) Evidence of natural hybridization in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Journal of Genetics*. 89(1): 91-94.

Bonato ALV, Valle CB do, Jank L, Penteado MIO, Leguizamon G. (2002) Determinação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares em acessos de *Brachiaria* spp.. In: Anais da XXXIXa Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.

Borém A & Caixeta ET. (2006) Marcadores moleculares. Viçosa: Editora UFV, 374p.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. 32:314-331.

Briggs D & Walters SM. (1997) *Plant Variation and Evolution*. 3rd edition. Cambridge University Press.

Calderini O, Chang SB, Jong H, Busti A, et al. (2006) Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixes-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 1179-1191.

Calisto V, Fuzinato VA, Message HJ, Mendes-Bonato AB, Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2008) Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. *Journal of Genetics*. 87(1): 27-31.

Cançado LJ. (2009) Caracterização da diversidade genética molecular em germoplasma de *Brachiaria* spp. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, SP. 89p.

Carneiro MS & Vieira MLC (2002) Mapas genéticos em plantas. *Bragantia*. 61(2): 89-100.

Carneiro VTC & Dusi DMA (2002) Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 25: 36-42.

Cervantes-Flores JC, Yencho GC, Kriegner A, Pecota KV, Faulk MA, Mwangi ROM, Sosinski BR. (2008) Development of a genetic linkage map and identification of homologous linkage groups in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding*. 21:511-532.

Chiari L, Bitencourt GA, Salgado LR et al. (2007a) Identificação precoce de híbridos de *Brachiaria humidicola* por marcadores moleculares. In: Simpósio Internacional de Melhoramento de Forrageiras. Campo Grande, MS. [Anais] CD-ROM, ISBN: 978-85-297-0221-6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Chiari L, Salgado LR, Valle CB do, Jungmann L, Valle JV do, Leguizamon GOC. (2007b) Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 22. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Chiari L, Rocha M da, Valle CB do, Salgado LR. (2008) Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 24. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 10(2):349-356.

Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, et al. (2008) Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant physiology*. 147(3): 1396-411.

Crane CF & Carman JG. (1987) Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany*. 74: 477-496.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A. (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299-306.

Cruz R, Miles JW, Roca W, Ramírez H. (1989) Apomixis y sexualidad en *Brachiaria*. 1. Estudios bioquímicos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 23(3): 301-305.

Da Silva JAG. (1993) A methodology for genome mapping of autopolyploids and its application to sugarcane (*Saccharum* spp.). Ph.D. dissertation, Cornell University, Ithaca, N.Y. 108p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Dall'Agnol M & Schifino-Wittmann MT. (2005) Apomixia, genética e melhoramento de plantas. Revista Brasileira de Agrociência. 11: 127-133

De Silva HN, Hall AJ, Rikkerink E, McNeilage MA, Fraser LG. (2005). Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. Heredity. 95: 327-334.

Darlington CD, Wylie AP. Chromosome atlas of flowering plants. Allen an Unwin, Londres, R.U., 1955.

de Wet JMJ (1980) Origins of polyploids. In: Lewis WH (ed.) Polyploidy: Biological Relevance. New York, Plenum Press, pp. 3-15.

Dewey DR. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: Lewis WH. Polyploidy: biological relevance. New York: Plenum. 1980. p. 445-469.

Diáz M, Echenique V, Schrauf G, Cardone S, Polci P, Lutz B, Spangenberg G. (2004) Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. Ria-INTA. Argentina. 33:77-104.

Dusi DMA & Williamse MTM (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf: gametophytic development and reproductive calendar. Acta Biologica Cracoviensia Series Botânica. 41: 151-162.

Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahara M, Nakajima K. (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). Grassland Sciences. 51: 71-78.

Esselink GD, Nybom H, Vosman B (2004). Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting—peak ratios) method. Theoretical and Applied Genetics 109: 402–408.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Euclides VPB, Valle CB do, Macedo MCM, Almeida RG de, Montagner DB, Barbosa RA (2010) Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of the XXI century. *Revista Brasileira de Zootecnia (Online)*. 39: 151-168.

Felismino MF, Pagliarini MS, Valle CB do, Resende RS. (2006) Avaliação da viabilidade polínica em acessos e híbridos de *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). In: 52º Congresso Brasileiro de Genética. Foz do Iguaçu, PR. [Anais] CD-ROM. Ribeirão Preto: SBG.

Felismino MF, Silva N, Pagliarini MS, Valle CB do. (2008a) Mitotic behavior in root tips of *Brachiaria* genotypes with meiotic chromosome elimination during microsporogenesis. *Genetics and Molecular Research*. 7(2): 336-341.

Felismino MF, Pagliarini MS, Valle CB do. (2008b) A differential phenotypic expression of a divergent spindle mutation in interspecific *Brachiaria* hybrids. *Cell Biology International*. 32(11): 1459-1463.

Ferguson JE & Crowder LV. (1974) Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Crop Science*. 14: 893-895.

Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007a) Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). *Genetics and Molecular Research*. 6(4): 1107-1117.

Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007b) Evidence of programmed cell death during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) hybrid. *Genetics and Molecular Research*. 6(2): 308-315.

Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do. (2008) Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* hybrid (Poaceae) collected in distinct years. *Genetics and Molecular Research*. 7(2): 424-432.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Gallo PH, Micheletti PL, Boldrini KR, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007) 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *Euphytica*. 154(1-2): 255-260.

Garcia AAF, Kido EA, Meza NA, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, Silva JAG, Ulian EC, Figueira AVO, Souza AP. (2006) Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 298-314.

Gardner EJ & Snustad P. *Genética*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. 497p.

Gauer L & Cavalli-Molina S. (2000) Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*. 6(1): 157-170.

Gobbe J, Swenne A, Louant BP. (1981) Diploides naturels et autotétraploïdes induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: critères d'identification. *Agronomie Tropicale*. 36: 339-346.

Goel S, Chen Z, Akiyama Y, Conner JÁ, Basu M, Gualtieri G, Hanna WW, Ozias-Atkins P. (2006) Comparative Physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics*. 173: 389-400.

Goldstein Bd & Schlotterer C. (2001) *Microsatellites: evolution and application*. Oxford: Oxford University Press. 352p.

Gonzalez AMT & Morton CM. (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37(1): 36-44.

Gouveia-Santos A. (2001) *Urochloa*. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giuliatti AM (Eds), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo: Poaceae*. Vol. 1, pp. 243-245.

Grant V. (1981) Plant Speciation. 2nd. Edition. New York: Columbia University Press.

Grattapaglia D & Sederoff RR (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E.urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. Genetics. 137: 1121-1137.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introdução à genética. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. 856p.

Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, Gonzáles-de-León D, Savidan Y. (1998) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? Heredity. 80:40-47.

Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed.) Flora Rossica, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp. 324-484.

Grivet L, D'Hont A, Roques D, Feldmann P, Lanaud C, Glaszmann J.C. (1996). RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. Genetics. 142: 987-1000.

Gualtieri G, Conner JÁ, Morishige DT, Moore LD, Mullet JE, Ozias-Atkins P. (2006) A segment of the apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and buffelgrass, but also with a Rice chromosome 11 centromeric-proximal genomic region. Plant Physiology. 140: 963-971.

Gustine DL, Sherwood RT, Huff DR. (1997) Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. Crop Science. 37: 947-951.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Hacker JB. (1988) Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. Tropical Grasslands. 22(3):139-144.

Haldane JBS. (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. Journal of Genetics. 8: 299-309.

Harlan JR & de Wet MJM (1975) On O. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. Botanical Review. 41:361-390.

Herr JM. (1971) A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. American Journal of Botany. 58:785-790.

Hu J & Vick BA. (2003) Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. Plant Molecular Biology Reporter. 21: 289–294.

Huo H, Conner JA, Ozias-Akins P. (2009) Genetic mapping of the apospory-specific genomic region in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon-based molecular markers. Theoretical and Applied Genetics. 119(2): 199-212. doi: 10.1007/s00122-009-1029-y.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2006) Censo Agropecuário. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Governo Brasileiro.

Jamnadas R, Mace ES, Hiernaux P, Muchugi A, Hanson J. (2006) Population genetic responses of wild forage species to grazing along a rainfall gradient in the Sahel: A study combining phenotypic and molecular analyses. Euphytica. 151(3):431-445.]

Jannoo N, Grivet L, Dookun A, D'Hont A, Glaszmann JC. (1999) Linkage disequilibrium among sugarcane cultivars. Theoretical and Applied Genetics. 99: 1053-1060.

Jungmann L, Sousa ACB, Paiva J, Francisco PM, Vigna BBZ, Valle CB do, Zucchi MI, Souza AP. (2009a) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. Conservation Genetics. 10(6): 1873-1876. doi:10.1007/s10592-009-9839-7

Jungmann L, Vigna BBZ, Paiva J, de Sousa ACB, Valle CB do, Laborda PR, et al. (2009b). Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. Conservation Genetics Resources. 1(1): 475–479. doi:10.1007/s12686-009-9111-y.

Kelemu S, Thomas RJ, Moreno CX, Ocampos GI (1995) Strains of *Bradyrhizobium* from tropical forage legumes inhibit *Rhizoctonia solani* AG-1 in vitro. Australasian Plant Pathology. 24:168-172.

Keller-Grein G, Maass BL, Hanson J. (1996) Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, Colombia. pp. 16-42.

Kihara H & Ono T. (1926) Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. Z Zellforsch mikr Anatomie. 4:475-481.

Koltunow AM. (1993) Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell. 5:1425-1437.

Koltunow AM & Grossniklaus U. (2003) Apomixis: a developmental perspective. The Annual Review of Genetics. 54: 547-74.

Kosambi DD. (1944) The estimation of map distance from recombination values. Annuaire of Eugenetics.12:172-175.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Kumar LS. (1999) DNA markers in plant improvement. *Biotechnology Advances*. 17:143-182.

Lander ES, Green P, Abrahamsom J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1: 174-181.

Lapointe SL & Miles JW. (1992) Germplasm case study: *Brachiaria species*. In: Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution. CIAT, Cali, Colombia. pp 43-55.

Laspina NV, Veja T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarin CL, Pessino SC. (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology*. 67: 615-628.

Leblanc O & Mazzucato A. Screening procedures to identify and quantify apomixis. In: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T. (eds.). The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. El Batan: CIMMYT, 2001. p. 121-136.

Leitch IJ & Bennet MD. (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*. 2:470-476.

Leopoldino WM. (2000) Avaliação nutricional de pastagens consorciadas com leguminosas tropicais, dinâmica ruminal e produção de leite de vacas mestiças. Dissertação de Mestrado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 49p.

Levin DA (2002) The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. New York: Oxford University Press. p.163-184.

Lincoln SM, Daly M, Lander E. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Report, 2nd Edn. 1993.

Litt M & Luty JA. (1989) A hipervariável microsatélite revelado por in vitro amplificação de um dinucleotídeo repetido dentro do gene da actina muscular cardíaca. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-101.

Liu BH. *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. 1998. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC. 611p.

Luo ZW, Zhang Z, Zhang RM, Pandey M, Gailing O, Hattermer HH, Finkeldey R. (2006). Modeling Population Genetic Data in Autotetraploid Species. *Genetics*. 172: 639-646.

Lutts S, Ndikumana J, Louant BP. (1984) Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F₁ híbridos com colchicina sexualmente induzidos tetraploides *Brachiaria ruziziensis*. *Euphytica*. 78: 19-25.

Macedo MCM. (2006) Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa RA (ed.) *Morte de pastos de braquiárias*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. p. 35-36.

Maliepaard C, Jansen J, Ooijen JW. (1997) Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genetical Research*. 70:237-250.

Manly KF, Curmore-Robert H, Meer JM (2001) Map Manager QTX, cross platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome*. 12: 930-932.

Margarido GR, Souza AP, Garcia AAF. (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*. 144:78-79.

Mather K. (1957) *The measurement of linkage in heredity*. Methuen & Co. LTD., London, UK.

Mendes DV, Boldrini KR, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006) Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 150(4): 441-446.

Mendes-Bonato AB, Junqueira Filho RG, Pagliarini MS, Valle CB do. (2002) Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology International*. 26: 641-646.

Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L. (2004) Abnormal pollen mitoses (PM I and PM II) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria decumbens* (Gramineae). *Journal of Genetics*. 83(3): 279-283.

Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006a) Chromosome number and meiotic behaviour in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *Journal of Genetics*. 85(1): 83-87.

Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006b) Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. *Genetics and Molecular Biology*. 29(1): 122-125.

Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006c) Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 29(4): 711-714.

Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do. (2007) Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(5): 831-837.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Miles JW, Maass BL, Maas BL, Valle CB do (1996) *Brachiaria*: biology, agronomy and improvement. Embrapa/CIAT, Cali, Colombia. 288p.

Miles JW & Valle CB do. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: Miles JW, Mass BL, Valle CB do (eds.). *Brachiaria*: biology, agronomy and improvement. Colombia: CIAT, 1996. p. 164-177.

Miles JW, Escandon ML. (1997). Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. Canadian Journal of Plant Science. 77: 105–107.

Miles JW, Valle CB do, Rao IM, Euclides VP. (2004) Brachiariagrasses. In: Al-Amoodi LK, Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds.) Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45. American Society of Agronomy, Madison, pp. 745-783.

Mollinari M, Margarido GRA, Venconsky R, Garcia AAF. (2009) Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. Heredity. 103(6):494-502. doi: 10.1038/hdy.2009.96

Morrone O & Zuloaga FO. (1992) Revisión de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). Darwiniana. 31(1–4): 43–109.

Morton N. (1955) Sequential tests for the detection of linkage. American Journal of Human Genetics. 7: 277-318.

Mullis KB & Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology. 155:335-350.

Ngendahayo M. Mécanismes de la reproduction dans le genre *Brachiaria* Gris. et stratégies d'amélioration et de sélection. Tese de Doutorado. Louvain: Université Catholique de Louvain, 1988. 165p.

Nielen S, Almeida LM, Carneiro VTC, Araújo ACG. (2010) Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. Sexual Plant Reproduction. 23(1): 45-51.

Nogler GA. (1984) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. conclusion. Botanica Helvetica. 94: 411 – 422.

Obbard DJ, Harris SA, Pannell JR. (2006). Simple allelic-phenotype diversity and differentiation statistics for allopolyploids. Heredity. 97: 296–303.

Oliveira KM. (2007) Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, SP. 165p.

Oliveira KM, Pinto LR, Marconi TG, Margarido GRA, Pastina MM, Teixeira LHM, Figueira AV, Ulian EC, Garcia AAF, Souza AP. (2007) Functional integrated genetic linkage map based on ESTmarkers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. Mol Breeding. 20:189-208.

Olufowote JO, Xu YB, Chen XL, Park WD, Beachell HM, Dilday RH, Goto M, McCouch SR. (1997) Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L) using microsatellite and RFLP markers. Genome. 40(3): 370-378.

Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna W, McNay JW. (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. Theoretical and Applied Genetics. 85: 632-638.

Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW. (1998) Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus which may have no allelic form in sexual genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 5127-5132.

Ozias-Akins P, Akiyama Y, Hanna WW. (2003). Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Functional and Integrative Genomics*. 3: 94-104.

Ozias-Akins P & van Dijk P J (2007) Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. *Annual Review of Genetics*. 41: 509-537.

Parsons J. (1972) Spread of African pasture grasses to the American tropics. *Journal of Range Management*. 25:12-17.

Pereira AV, Valle CB do, Ferreira RP, Miles JW. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass LL, Valois ACC, Mello IS, Valadares-Ingis MC (eds.). *Recursos genéticos e melhoramento – plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. pp. 550-601.

Pessino SC, Ortiz J, Leblanc O, do Valle CB, Hayward MD. (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 439–444.

Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB, Hayward MD. (1998). A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas*. 128: 153–58.

Pessino SC, Ortiz JPA, Hayward MD, Quarín CL. (1999) The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas*. 130:1-11.

Peters M, Franco LH, Schimidt A, Hincapie B (2003) *Especies forrajeras multipropósito: opciones para productores de centroamérica*. CIAT Publication No. 333. CIAT, Cali.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Pinheiro AA, Pozzobon MT, Valle CB do, Penteado MIO, Carneiro VTC. (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports*. 19: 274-278.

Pires W. (2006) Manual de pastagem: formação, manejo e recuperação. Ed. Aprenda Fácil – Viçosa, MG. 302p.

Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S. (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics*. 270: 539-548.

Pupo NIH. Manual de pastagens e forrageiras. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1980. 344p.

Rafalsky JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Tingey SV. (1996) Generating new DNA marker in plants. In: Birren B, Lai E. (Ed.) *Analysis of non mammalian genome: a practical guide*. Orlando: Academic Press. p.75-134.

Rafalsky A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:94-100.

Ramsey J, Schemske DW. (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 29:467-501.

Ramsey J & Schemske DW. (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 33: 589-639.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS. (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, Colombia. pp 1-15.

Ripol MI, Churchill GA, Da Silva JAG, Sorrells M. (1999) Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene*. 235: 31–41.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L. (2004a) Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruzizensis* and *B. brizantha*. *Plant Cell Reports*. 23(5): 304-310.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L. (2004b) Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. *Plant Cell Reports*. 22(12): 945-950.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2005) Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruzizensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica*. 145(1-2): 155-159.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006a) A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetics Research and Crop Evolution*. 53:7-10.

Risso-Pascotto C, Mendes DV, Silva N, Pagliarini MS, Valle CB do. (2006b) Evidence of allopolyploidy in *Brachiaria brizantha* (Poaceae: Paniceae) through chromosome arrangement at metaphase plate during microsporogenesis. *Genetics and Molecular Research*. 5(4): 797-803.

Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, de Mello LV, Rigden DJ, Carneiro VTC. (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology*. 53(6): 745-757.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Savidan YH. (1982) Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. Trav. Et Doc. Orstom. 153: 1-159.

Savidan YH. (2000) Apomixis: genetics and breeding. Plant Breeding Reviews. 18: 13-86.

Schifino-Wittmann MT. (2004) Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. Revista Brasileira de Agrociência. 10(2): 151-157.

Schlotterer C & Tautz D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research. 20 (2): 211-215.

Sendulsky T. (1978) *Brachiaria*: taxonomy of cultivated and native species in Brazil. Hoehna. 7:99-139.

Serrão EAS. (1977) Adaptação de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia. In: Empresa Goiana De Pesquisa Agropecuária, Goiânia, GO. Encontro sobre forrageiras do gênero *Brachiaria*. p.31.

Serrão EAS & Simão Neto MS. (1971) Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard. IPEAN (Belém) Série de estudos sobre forrageiras na Amazônia 1: 31.

Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, da Silva FR, Carneiro VTC. (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. BMC Plant Biology. 9: 84. doi:10.1186/1471-2229-9-84

Simioni C & Valle CB do. (2009) Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 9: 328-334.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Smith LB, Wasshausen DC, Klein RM. Gramíneas. Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1982. 504p.

Soltis DE & Soltis PS. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Critical reviews in Plant Science. 12: 243.

Soltis DE & Soltis PS. (1995) The dynamic nature of polyploid genomes. Proc Natl Acad Sci USA. 92:8089-8091.

Soltis DE & Soltis PS. (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. Trends in Ecology & Evolution. 14:348-352.

Sousa ACB. (2010) Estudos genético-moleculares em forrageiras tropicais. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, SP. 206p.

Souza SO. (2002) Comportamento de gramíneas forrageiras tropicais isoladas e em associações com leguminosas no Norte-Fluminense. Ciências e Agrotecnologia. 4: 1554-1561.

Souza-Kaneshima AMS, Ricci GCL, Pagliarini MS, Valle CB do. Comportamento meiótico em híbridos pré-selecionados de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick (Poaceae). (no prelo)

Stam P. (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. Plant Journal. 3(5): 739-744

Stebbins GL. (1947) Types of polyploids: their classification and significance. Advances in Genetics. 1:403-429.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Stebbins GL. (1950) Variation and Evolution in Plants. New York: Columbia University Press.

Stebbins GL. (1971) Chromosomal Evolution in Higher Plants. London: Addison-Wesley.

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA. (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. Theoretical and Applied Genetics. 109: 186-191.

Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarin CL, Ortiz JPA. (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. Mol Breeding. 20: 153-166.

Sturtevant AH. (1913) Linear arrangement of sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. Journal of Experimental Zoology. 14: 43-59.

Sybenga J. (1996) Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? Genome. 39:1176-1184.

Swenne A, Louant BP, Dujardin M. (1981) Induction par la colchicines de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). Agronomie Tropicale. 36:134-141.

Tate JA, Soltis DE, Soltis PS. Polyploidy in Plants. In: Gregory TR (ed.) The Evolution of the Genome. 2005. Elsevier.

Tautz D. (1989) Hipervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 17:6463-6471.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Thompson RA, Estes JR. (1986) Anthecial and foliar micromorphology and foliar anatomy of *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *American Journal of Botany*. 73:398–408.

Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP. (1995) Isoenzimas - Variabilidade genética em plantas. Série Monografias no. 1. Sociedade Brasileira de Genética.

Thrall PH & Young A. (2000) AUTOTET: a program for the analysis of autotetraploid genotypic data. *Journal of Heredity*. 91: 348-349.

Torres Jr AM, Rosa FRT, Nogueira MP (2004) Mais boi em menos pasto. *Revista de Agronegócios da FGV*, agosto de 2004.

Trinius CB. (1834) Panicearum genera retractavit speciebusque compluribus illustravit. The copy in the smithsonian libraries, dated June 1834 in pencil, is paginated from 1 through 267, and the title page indicates neither city nor publisher. It is a preprint of the paper with the same title in the following: 1835, *Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg*, sixth series (Sciences Naturelles). 1: 89-355.

Utsunomiya KS, Pagliarini MS, Valle CB do. (2005) Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). *Biocell*. 29(3): 295-301.

Valle CB do. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande – MS: Embrapa Gado de Corte, 1990. 33p. (Boletim de Pesquisa, 46).

Valle CB, Savidan YH. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles, J.W.; Maass, B.L.; Valle, C.B. do (eds.). *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Colombia: CIAT, 1996. p. 47-163.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Valle CB do, Bonato ALV, Pagliarini MS, Resende RMS, Jank L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V.T.de C.; DUSI, D. M. de A. (eds.). Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Brasília: Embrapa, 2004a. p. 47-65.

Valle CB do, Jank L, Resende RMS, Cançado LJ. (2004b) O papel da biotecnologia de forrageiras para a produção animal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia 41. Anais...Campo Grande, SBZ. CD-ROM. Forragicultura.

Valle CB do. (2007) A citogenética e o melhoramento de *Brachiaria*. In: 11º Simpósio de Atualização e Melhoramento de Plantas. Lavras, MG. Anais... Lavras: UFLA, pp.84-103.

Valle CB do, Simioni C, Resende RMS, Jank L (2008) Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: Resende RMS, Valle CB do, Jank L (eds.) Melhoramento de Forrageiras Tropicais. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. pp 13-54.

Valle CB do, Macedo MCM, Euclides VPB, Jank L, Resende RMS. Gênero *Brachiaria*. In: Dilermando Miranda da Fonseca, Janaína Azevedo Matuscello (Org.) Plantas Forrageiras. Viçosa: Editora UFV, 2010, p. 30-77.

Van Oosterom EJ & Ceccarelli, S. (1993) Indirect selection of grain yield of barley in harsh Mediterranean environments. *Crop Science*. 33: 1127-1131.

Veldkamp JF. (1996) Proposal to conserve the name *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Gramineae) with a conserved type. *Taxon*. 45:319-320.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23 (21): 4407-14.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Walton PD. Production and management of cultivated forages. Reston: Reston Publishing, 1983. 336p.

Weber RD & May PE. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Human Genetics*, 44:388-396.

Webster RD. (1987) *The Australian Paniceae (Poaceae)*. J. Cramer, Berlin and Stuttgart.

Welsh J & McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18:7213-7218.

Williams JGK, Kubelik A, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.

Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 294–300.

Wu KS & Tanksley SD. (1993) Abundance, polymorphism and genetic-mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics*. 241(1-2): 225-235.

Wu R, Ma CX, Painter I, Zeng ZB. (2002) Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phase in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*. 61: 349–363.

Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu Q, Tsuruta S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Takahara M, Takamizo T, Sugita S, Nakagawa H. (2009) Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology*. 166: 750-761.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. (1979) Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*. 57:1668-1672.

Zorzatto C, Chiari L, Bitencourt GA, Valle CB, Leguizamon GOC, Schuster I, Pagliarini MS. (2010) Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Plant Breeding*. doi:10.1111/j.1439-0523.2010.01763.x

Zuloaga FO & Morrone O. (2003) *Brachiaria, Urochloa*. In: Zuloaga FO, Morrone O, Davidse G, Filgueiras TS, Peterson PM, Soreng RJ, Judziewicz EJ (eds.) *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. Contributions from the United States National Herbarium*. 46:1-662.

ANEXO I

Characterization of 12 microsatellite loci from an enriched genomic library in polyploid *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae)

Vinícius L. G. Brito • Bianca B. Z. Vigna • Anete P. de Souza

V. L. G. Brito • A. P. de Souza
Plant Biology Department (DBV), Biology Institute,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas,
CP 6109, SP CEP 13083-970, Brazil

B. B. Z. Vigna • A. P. de Souza
Genetic Engineering and Molecular Biology Center,
University of Campinas (UNICAMP), CP 6010,
Campinas, SP CEP 13083-875, Brazil
e-mail: anete@unicamp.br

*O trabalho foi publicado pela revista *Conservation Genet Resour* (2010) 2:193–196

DOI 10.1007/s12686-010-9224-3

Received: 24 March 2010 / Accepted: 25 March 2010 / Published online: 9 April 2010

Abstract

Tibouchina pulchra is a common hermaphroditic canopy tree of the Melastomataceae in the Brazilian Atlantic Rain Forest that is important for bee communities, reforestation, soil and air bio-indication and urban ornamentation. Twelve polymorphic microsatellite markers were isolated and characterized in 89 genotypes of *T. pulchra* from two populations of Ubatuba and São Luís do Paraitinga municipalities (São Paulo, Brazil). The number of alleles observed for each locus ranged from 4 to 31 with an average of 12 alleles per locus. The polymorphism information content varied between 0.51 and 0.92 (average 0.74) and the discriminating power (D) ranged from 0.66 to 0.99 (average 0.87). These microsatellite markers will be useful for assessing genetic studies, conservation management, and ecological and phylogenetic evaluations.

Keywords Manacá-da-serra • Polymorphism • Microsatellite • Conservation genetics • Polyploidy

Biodiversity-rich habitats, like the Atlantic Rain Forest of Brazil, are major sources of plant products and ecosystem services, but fragmentation and reduction have occurred rapidly in such habitat. Understanding genetic structure, reproductive systems and gene flow of tree populations in such heterogeneous habitats is essential for studies in conservation, ecology and evolutionary biology (Narain 2000).

Tibouchina pulchra (Melastomataceae), known in Brazil as manacá-da-serra, is a common hermaphroditic canopy tree that grows in the Atlantic Rain Forest of Brazil. This plant produces many flowers with large amount of pollen and plays a critical role in this habitat, offering resources for pollinating large bees able to buzz the poricidal anthers. The tree's seeds are dispersed by gravity, have high germination capacity and often colonize recently fragmented areas (Zaia and Takaki 1998). Its leaves and roots are very sensitive to pollution and can be used as bio-indicators of air and soil quality (Mazzoni-Viveiros and Trufem 2004; Furlan et al. 2008). *T. pulchra* is a pioneer species used in environmental landscape planning and urban ornamentation (Lorenzi 1992). Genetic knowledge about *T. pulchra* is still limited, however, which has restricted its use and conservation. In this study, we report the development of 12 microsatellite loci for *T. pulchra*, which could be extremely important in the conservation genetic studies of the diversity in this species.

Young leaf tissues were collected from 89 genotypes in the field and stored in a freezer at -20°C. The genomic DNA samples were extracted from leaf tissue of *T. pulchra* using the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle 1987). A microsatellite-enriched library was constructed according to the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA samples were digested with *Rsa*I restriction enzyme, and the resulting DNA fragments were linked to *Rsa*I adapters. A library was enriched for dinucleotide sequences using (CT)₈ and (GT)₈ biotinylated microsatellite primers with labeled probes that were bound

to Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega, Fitchburg, WI, USA) as indicated by the manufacturer.

The selected fragments were amplified by PCR using primer sequences complementary to the adapters (Rsa21 50-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-30 and Rsa25 50-TA GTCCACGCGTAAGCAAGAGCACACA-30) and then cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were introduced into *Escherichia coli* XL-1 Blue strain cells and transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 µg ml⁻¹ ampicillin (Sigma, Germany), 50 µg ml⁻¹ X-galactosidase and isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (MBI Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). A total of 96 containing positive clones were bi-directionally sequenced in an automated sequencer ABI 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) using T7 and SP6 primers and the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using Seqman (DNASar). The Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT) was used to identify SSRs present in all non-redundant sequences (Temnykh et al. 2001). Fifty-four percent of the clones contained microsatellite motifs with more than 5 repeats and flanking regions suitable for primer design. The Primer Select (DNASar) software was used to design 33 primer pairs.

Eighty-nine genotypes from two populations in Ubatuba and São Luís do Paraitinga municipalities in the state of São Paulo, Brazil, were used to evaluate microsatellite polymorphisms. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in 25 µl total volume containing 4.0 ng of template DNA, 0.8 mM of forward and reverse primers, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM of each dNTP and 1 U Taq DNA Polymerase. A PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA/USA) was used for PCR with the following program: 96°C for 1 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, specific annealing temperature for 1 min and a final extension of 72°C for 5 min. Amplification products were verified by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.1 mg

ethidium bromide per ml in 1.9 TBE buffer (89 mM Tris–borate, 2 mM EDTA, pH 8.0) and genotyped on 6% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate (Creste et al. 2001). Allele sizes were estimated by comparison to a 10 bp DNA ladder standard (Invitrogen).

Twelve microsatellite markers were successfully amplified by PCR and had polymorphic alleles. A total of 140 putative alleles were obtained from the 12 loci. The number of alleles ranged from 4 to 31, with an average of 12 alleles per putative locus. Polymorphism information content (PIC) was calculated in order to estimate marker informativeness (Cordeiro et al. 2003). The PIC values of the 12 microsatellite loci ranged from 0.51 to 0.92 (average 0.74). The highest PIC value was found in the TP03 locus, which contained the most alleles (31 alleles). For the purposes of comparing the efficiency of markers in genotype identification, we estimated the discriminating power (D) of each primer (Tessier et al. 1999). The calculated D values ranged from 0.66 to 0.99 (average 0.87). The highest D values were found in TP03 (0.99) and TP01 (0.99), which had the highest PIC values (Table 1). The polyploid nature of *T. pulchra* does not allow for estimation of the exact copy number of each allele. Therefore, standard tests for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were not applied.

These microsatellite markers can contribute to genetic analysis, conservation, phylogenetic evaluations and ecological and evolutionary studies for this species.

Acknowledgments V.L.G.B., B.B.Z.V. and A.P.S. are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for fellowships and financial support, to Fernanda Witt Cidade and Gustavo Maruyama Mori for technical support and to Adna Cristina Barbosa de Sousa and Graham Wyatt for critical review of the manuscript. Special thanks to Marlies Sazima for helpful scientific contributions during discussions which originated this work. This work was supported by Projeto

Temático Gradiente Funcional (Processo 03/12595-7) Programa BIOTA/FAPESP-O Instituto Virtual da Biodiversidade (www.biota.org.br).

References

Billotte N, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288

Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2003) Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploidy species. *Plant Sci* 155:161–168

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19:299–306. doi:10.1007/BF02772828

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15

Furlan CM, Moraes RM, Bulbovas P, Sanz MJ, Domingos M, Salatino A (2008) *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic forest species, as a bio-indicator of ozone: visible injury. *Environ Pollut* 152(2):361–365

Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa

Mazzoni-Viveiros SC, Trufem SFB (2004) Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* cogn. (Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia rev. Bras Bot 27(2):337–348

Narain P (2000) Genetic diversity–conservation and assessment. *Curr Sci* 79(2):170

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Catinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome* 11:1441–1452

Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* 98:171–177

Zaia JE, Takaki M (1998) Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cong. e *Tibouchina granulosa* Cong. (Melastomataceae). *Acta bot bras.* 12(3):221–229

Table 1 Characterization of 12 microsatellites in *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae)

SSR locus	GenBank accession number	Repeat motif	<i>T_a</i>	Predicted product size (bp)	Primers sequences (5' - 3')	<i>N_b</i>	<i>N_i</i>	Size range (bp)	D	PIC
TP01	GU583789	(CA) ₂ AG(CA) ₈	60	160	F:AATTCACCCCTCCCCTCTATCT R:TTCATTGGTTCTTTGGCTGTAA	14	1 - 4	157-180	0.985	0.8736
TP03	GU583790	(TC) ₁₀ (CT) ₇ (CA) ₉ (TA) ₂ (CA) ₄	60	208	F: CTGGGTCCGAGGTCAACA R: TTCTTCTTCATATGCTTCTCAAA	31	1 - 6	262-185	0.992	0.9230
TP05	GU583791	(TTA) ₃ (ATT) ₃	60	248	F: ACGCAGTACAACCCCTTAT R: CACACGTCTCAATTTTATCAT	10	1 - 3	261-171	0.951	0.7919
TP10	GU812340	(AC) ₆	60	166	F: GGGGGTTGGGTTTATTTTA R: GGATTCCAGCCTTGATTTT	4	1 - 2	166-170	0.706	0.5296
TP12	GU583793	(GTT) ₆	60	258	F: ATAATCCAACCTCCACAAA R: GCCAATACCAATACCAATACCC	17	1 - 4	281-241	0.973	0.8706
TP20	GU784837	(CGT) ₃	50	251	F: CCCAGTTCAATCAATCATA R: CCTCAAGGTTGAAAGAGTTA	4	1 - 2	250-233	0.77	0.5474
TP23	GU784835	(TG) ₉	60	151	F: GACTACCCAGAAAACCGCATCC R: CACCCGCCACTACGACCCT	11	1 - 4	160-147	0.94	0.7614
TP25	GU784836	(GT) ₈	60	168	F: AAAAAAGCACAAGGGCAAAC R: AAGGCGCAAAGGATAAACAAC	7	1 - 3	181-165	0.906	0.7432
TP27	GU784838	(CTT) ₅	60	167	F: TTGGGATGGGATGGGATGGA R: GGGGCGAGGACAGGGACAG	5	1 - 3	188-166	0.66	0.5083
TP28	GU784839	(TGGGA) ₃	60	162	F: TTGGTGGGAAGAAGATAAAAG R: GGGGGAAGAAGAAGAAGAAG	15	1 - 4	169-197	0.916	0.7865
TP29	GU784840	(TG) ₆ (ATT) ₃	60	220	F: AGACGCCCTGACCTATTC R: TGTGCTTACGTACGCTCATT	8	1 - 2	225-200	0.716	0.6517
TP33	GU784841	(CTT) ₉ ...(TTTTCC) ₃	60	239	F: CATTCAATTGACTACCCAT R: AGGTATCGATGTAATAAAGTGA	14	1 - 4	247-228	0.977	0.8661

T_a is specific annealing temperature (°C); *N_b* is total number of bands; *N_i* is number of bands per individual